

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

JACQUES GENEVRAY

(1891-1953)

Le Médecin général Jacques Genevray est mort à Dijon le 28 octobre 1953.

Son nom, sa personnalité, sa carrière étaient inséparables des Instituts Pasteur d'Indochine auxquels il donna vingt années de sa vie de travail.

Jacques Genevray avait débarqué à Saigon pour la première fois en mai 1918 après avoir servi comme médecin de bataillon aux armées, pendant près de quatre ans, et mérité d'être cité à l'ordre, à trois reprises.

Mais c'est à peine s'il eut le temps de se reconnaître et, dès le mois de juillet de la même année, il était désigné pour rejoindre les quelques éléments français qui, en Sibérie, vécurent les premiers épisodes de la révolution russe dans ses flux et reflux successifs.

De retour en France, c'est en 1921 que s'affirma la vocation de Jacques Genevray. En stage à l'Institut Pasteur, il y fut remarqué par R. Legroux qui dirigeait le Cours de Microbiologie et c'est assez dire les qualités que manifestait déjà l'élève, qui ne tarda pas d'ailleurs à devenir l'ami du Maître. Près de R. Legroux, Genevray devait trouver dès lors, et pendant toute

sa carrière, conseils et soutien quand il était Outre-Mer et accueil chaleureux du laboratoire pendant ses séjours en Métropole.

Il fit ses premières armes en bactériologie et prit ses premières responsabilités à l'Institut Gaston-Bourret, à Nouméa, de 1922 à 1926.

Mais, en 1927, Jacques Genevray fut désigné pour les Instituts Pasteur d'Indochine. Il ne devait les quitter qu'en 1947.

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Hanoï à son arrivée, il devint Directeur de cet Institut en 1932 et prit en 1942, dans des conditions difficiles mais que son sens politique lui permettait de contrôler, la Direction générale des quatre Etablissements de l'Institut Pasteur en Indochine.

Dans le même temps, l'armée coloniale reconnaissant les services rendus par l'un des siens à la culture scientifique française, en Indochine, assura à Jacques Genevray les promotions successives de grade correspondant au travail fourni et aux responsabilités encourues. Il était Médecin général le 20 mai 1942.

Pendant des années, Jacques Genevray assura également, à l'Ecole de Médecine puis à la Faculté de Hanoï, les fonctions de chargé de Cours de Bactériologie et forma aux disciplines pasteuriennes de très nombreux étudiants vietnamiens.

Au cours de sa carrière outre-mer, J. Genevray eut l'occasion d'étudier la plupart des affections exotiques. La Nouvelle Calédonie l'initia à la lèpre, à la filariose, aux spirochétoses ; en Indochine, et à une échelle différente, il eut à s'intéresser aux grands problèmes d'hygiène et de prophylaxie dont le paludisme, la rage, l'épuration des eaux de boisson. Mais deux questions le passionnèrent qu'il connaissait particulièrement et il se consacra surtout à l'étude du choléra, l'affection épidémique par excellence de l'Indochine, et à celle de la mélioïdose, cette infection relativement rare et dont la localisation étrange à l'Extrême-Orient n'a pas encore reçu d'explication satisfaisante.

★ ★

Parmi la quarantaine de mémoires et de notes que rédigea Jacques Genevray l'on remarqua plus particulièrement ses communications à la Société de Biologie sur la résistance du vibron cholérique à l'action du sel, la durée de conservation de ce vibron dans les aliments annamites, la dissociation du vibron cholérique sous l'action du chlore, de l'acide phénique... En ce qui concerne

la mélioidose, J. Genevray s'attacha surtout avec R. Legroux à l'étude comparative du bacille de Whitmore et du bacille pyocyanique et au problème de mutation possible de ces deux germes.

★ ★

La personnalité de Jacques Genevray lui attirait la sympathie générale. Largement cultivé, il avait une prédilection pour les études de synthèse et sa philosophie souriante de l'existence lui faisait ici encore négliger les détails et explique ses succès de Professeur et de Directeur.

Quand l'heure vint pour lui de la retraite, il se retira, sans amertume, dans sa Bourgogne natale où les fonctions de Président du Conseil d'Administration de l'Institut d'Hygiène de Dijon le rattachaient encore à la bactériologie.

Avec le Médecin général Jacques Genevray disparaît une belle figure de Médecin colonial. Il avait voué son existence à un Pays et à un Etablissement, et en les servant avec distinction et dévouement, il a bien servi en même temps son propre Pays, la Science et le Corps de Santé colonial.

**LES SYNTHÈSES CHIMIQUES
RÉALISÉES PAR LES RAYONS X
ET PAR D'AUTRES AGENTS PHYSIQUES
PEROXYDANTS (RAYONS ULTRA-VIOLETS
ET ULTRA-SONS)**

par J. LOISELEUR (*).

(Institut Pasteur. Service de Chimie Physique.)

Comme il a été montré précédemment [1], la présence de l'oxygène est indispensable à l'action des rayons X : l'oxygène, activé par le rayonnement, se fixe sur la molécule irradiée en formant, sur cette molécule, un radical peroxyde primaire. A partir de ce moment, le sens de l'action des rayons X va dépendre essentiellement de la masse de la molécule irradiée. S'il s'agit d'une molécule à poids moléculaire élevé — un protéide par exemple —, le radical peroxyde induit une oxydation progressive dans sa propre molécule et entraîne la desmolyse de cette molécule : c'est l'action destructrice bien connue des rayons X et que les radiologues utilisent journellement. Par contre, si le peroxyde est formé sur une molécule organique de faible poids moléculaire, le radical peroxyde est contraint d'agir sur une autre molécule en entraînant ainsi la condensation de deux molécules : c'est l'action synthétique des rayons X que nous allons considérer ici. Nous constaterons finalement que ce pouvoir est partagé, à des degrés divers, par d'autres agents physiques qui sont capables d'activer l'oxygène : les rayons X, les rayons ultra-violet et les ultra-sons.

**I. — LA RADIO-SYNTHESE PROGRESSIVE
ET L'ÉVOLUTION DES MOLÉCULES PHÉNOLIQUES
APRÈS LEUR IRRADIATION PAR LES RAYONS X.**

Nous allons d'abord considérer un premier mode de synthèse qui se manifeste progressivement et au cours des heures qui suivent l'irradiation. Ce « post-effet » présente l'intérêt de repro-

(*) Manuscrit reçu le 5 novembre 1953.

duire *in vitro* la latence nécessaire à la manifestation des effets de l'irradiation quand cette dernière intéresse un matériel vivant.

L'expérience consiste à irradier la solution d'une molécule à radical phénolique et à observer cette solution après son irradiation. Nous allons constater que cette solution se pigmente progressivement ; et cette évolution constitue la manifestation de la synthèse progressive d'une nouvelle molécule, le pigment.

La molécule expérimentée est dissoute dans un tampon (Clark et Lubs). Les conditions expérimentales doivent évidemment être choisies de façon que le témoin non irradié reste stable pendant plusieurs jours. Cette condition est réalisée par l'acide gallique à 1 p. 100 et à pH = 2, l'adrénaline à 1 p. 1 000 et à pH = 4, le tannin à 5 p. 1 000 et à pH = 2 et la tyrosine à S/2 et à pH = 8.

On irradie avec le rayonnement du tungstène par un tube Machlett, filtration par 0,5 mm de béryllium, sous 37,5 KV et 20 mA, distance de l'anticathode à la surface irradiée = 5 cm, intensité à la surface du liquide = 120 000 r/minute, épaisseur de la solution irradiée = 3 mm.

L'irradiation est effectuée en présence d'oxygène, dont la présence est indispensable : en l'absence de ce gaz, on n'observe aucun effet dans le milieu irradié. En général, immédiatement après l'irradiation, la solution apparaît peu modifiée ; mais dans les heures qui suivent, on constate l'apparition d'une pigmentation dont l'intensité augmente progressivement. Cette évolution de la solution est suivie par la mesure de la densité optique.

Dans tous les cas, on constate :

1° Que l'irradiation entraîne une légère augmentation immédiate de la densité optique ;

2° Que cette densité optique continue à augmenter postérieurement au moment même de l'irradiation, en atteignant dans certains cas des valeurs considérables (courbe I) ;

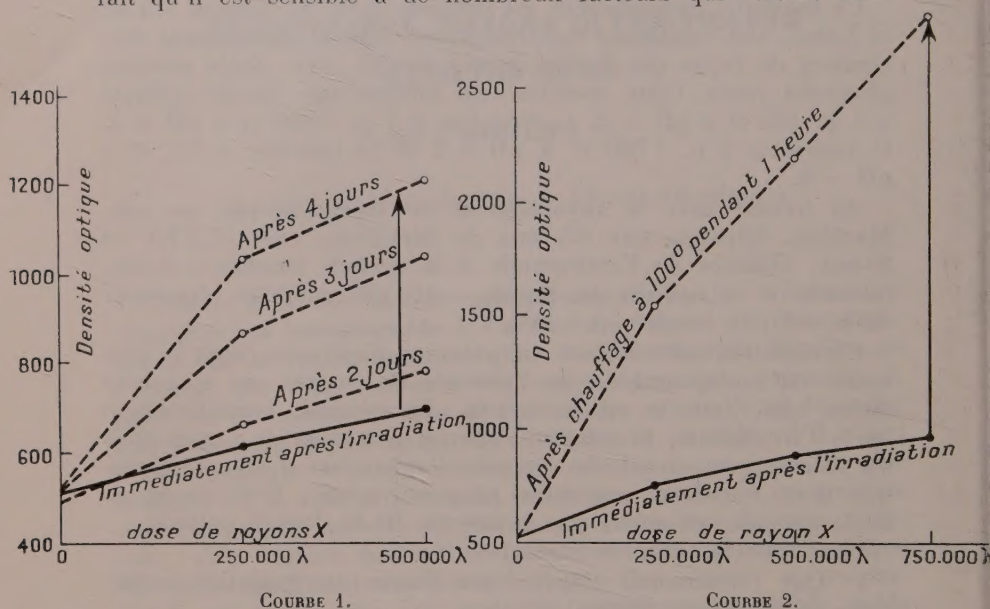
3° Que cette augmentation de la densité optique est d'abord proportionnelle à la dose de rayons X, puis se stabilise quand cette dose atteint une valeur excessive, cette stabilisation étant consécutive à l'intervention de l'hydrogène radio-formé.

DISTINCTION DE DEUX PHASES DANS L'ACTION DES RAYONS X : RADIO-OXYDATION PRIMAIRE ET POST-EFFET. — Les expériences précédentes mettent ainsi en évidence deux étapes successives et essentiellement différentes dans l'action des rayons X *in vitro*.

Il y a d'abord l'effet immédiat, se produisant au cours même de l'irradiation. Puisque, d'une part, l'oxygène est indispensable à l'efficacité du rayonnement et que, d'autre part, la présence des peroxydes est toujours constatée dans le milieu irradié, on a le droit de conclure que l'action primaire des rayons X est une

radio-oxydation où les molécules subissent une transformation individuelle en peroxydes.

La seconde phase, qui débute au cours même de la première, consiste dans la réaction progressive de ces radio-peroxydes élémentaires avec une autre molécule pour aboutir à des produits de condensation et à des formations de pigments. Ce « post-effet » peut être distingué d'une autre façon très caractéristique par le fait qu'il est sensible à de nombreux facteurs qui restent sans



COURBE 1. — Evolution d'une solution d'acide gallique (1 p. 100 à pH = 2) au cours des heures consécutives à l'irradiation.

COURBE 2. — Evolution d'une solution de tyrosine (S/2 à pH = 7,4) en présence de 6 μ/cm³ de SO₄Cu : 1° Après irradiation; 2° Après chauffage à 100°.

action sur l'effet immédiat des rayons X. Par exemple, la présence du cuivre (6 μg de SO₄Cu par centimètre cube) exerce un effet catalytique très marqué et entraîne une augmentation moyenne de 33 p. 100 de l'évolution secondaire (courbe II). En présence du cuivre, les phénomènes sont encore accélérés par la chaleur (I) ou la lumière solaire dont l'action est plus marquée quand le pH est acide.

Cette action du cuivre suggère un rapprochement entre cette

(1) Les solutions sont chauffées en ampoules scellées, au bain-marie à 100°, pendant une heure.

formation de pigments *in vitro* et la mélanogénèse où le cuivre se comporte également comme un activateur [2].

ACTION DES RÉDUCTEURS SUR LE POST-EFFET. — Il doit être possible de prévenir cette évolution secondaire de milieux chimiques bien définis, en les traitant aussitôt après l'irradiation, de la même façon que l'on tente de guérir les radio-lésions d'un organisme vivant, mais avec le bénéfice, dans le cas présent, d'une bien moins grande complexité.

Le problème est très simple et revient à stabiliser une solution de peroxyde. On ajoute donc, immédiatement après l'irradiation, un réducteur en solution dans un tampon identique à celui de la solution irradiée et on mesure les valeurs successives de la densité optique. Comme précédemment, les conditions expérimentales doivent être telles qu'un témoin non irradié et additionné du même réducteur reste stable pendant plusieurs jours. Le choix des réducteurs a été limité à ceux qui sont susceptibles d'être utilisés pour le traitement d'un organisme vivant.

On constate que certains réducteurs parviennent à diminuer et même à bloquer presque complètement le post-effet, c'est-à-dire à « guérir » en quelque sorte la solution chimique de l'évolution qu'elle allait subir après son irradiation. Ces réducteurs agissent dans les conditions suivantes :

1° Leur efficacité varie avec leur nature. Cette efficacité des agents de réduction est évaluée en comparant les densités optiques à celle d'un témoin irradié, puis abandonné seul sans traitement. Par exemple, pour l'acide gallique à 1 p. 100 et à pH = 2, on constate, le troisième jour après l'irradiation (courbes III et IV), que le post-effet a diminué de 38 p. 100, avec l'hyposulfite de Na, de 47 p. 100, avec la thiourée, de 71 p. 100 avec la cystéine et de 98 p. 100 avec l'acide ascorbique.

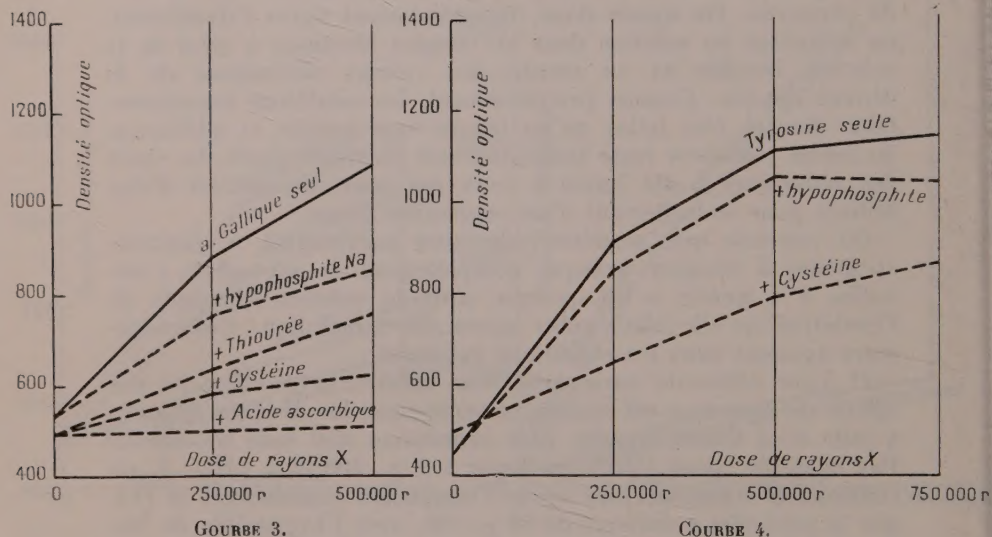
Il est à remarquer que l'acide ascorbique, très actif contre le post-effet des molécules phénoliques, constitue aussi un inhibiteur de la mélanogénèse [3], ce qui appuie encore le parallélisme entre cette dernière et la radio-formation de pigments réalisée ici *in vitro*.

2° L'action du réducteur est indépendante de la dose de rayons X (l'expérience a été limitée à la dose de 750 000 r). Ce fait implique : a) que, pour tout l'ensemble de molécules identiques présentes dans la solution au début de l'expérience, la radio-oxydation est restée du même type ; b) que l'augmentation de la dose intéresse seulement le taux des peroxydes radio-formés, mais sans modifier le degré d'oxydation de la molécule considérée ; c) que, pour une molécule organique de faible poids moléculaire, la molécule a subi, au cours de l'irradiation, le degré maximum d'oxydation compatible avec les conditions de l'expérience.

3° L'action du réducteur dépend du pH : par exemple, pour la tyrosine, la cystéine est plus active à pH = 6 qu'à pH = 7, fait normal puisque l'action de ces réducteurs repose sur des équilibres d'oxydo-réduction.

4° Ces réducteurs agissent proportionnellement à leur concentration : pour l'acide gallique à 1 p. 100 et à pH = 2, la cystéine est plus active à la concentration de 1 p. 100 qu'à celle de 0,5 p. 100.

Il faut encore noter que, dans le cas le plus favorable de ces



COURBE 3. — Action des réducteurs sur le post-effet de l'acide gallique (1 p. 100 à pH = 2), le troisième jour après l'irradiation.

COURBE 4. — Action des réducteurs sur le post-effet de la tyrosine (S/3 à pH = 7,4), le deuxième jour après l'irradiation.

expériences, la stabilisation du post-effet n'a pas pu être obtenue totalement, fait évident puisque les radio-péroxydes primaires commencent nécessairement à agir sur les autres molécules dès leur formation et pendant le cours même de l'irradiation, c'est-à-dire avant l'introduction du réducteur. Ceci souligne la grande difficulté d'un traitement curatif pour un organisme radio-lésé.

II. — LES SYNTHÈSES CHIMIQUES CONSÉCUTIVES A L'ACTION DES RAYONS X.

Dans le cas précédent de solutions phénoliques abandonnées à la température ordinaire après l'irradiation, la synthèse du

pigment est progressive. On peut maintenant donner une grande généralisation à ces actions de radio-synthèse, en précisant les conditions requises pour ces synthèses.

RELATION ENTRE LE POIDS MOLÉCULAIRE ET LE POST-EFFET. — Il convient d'abord de distinguer deux groupes d'expériences portant sur des solutions chimiques pures, mais où le post-effet aboutit à des résultats opposés.

a) *Le post-effet aboutit à des synthèses.* — C'est l'ensemble des expériences qui viennent d'être exposées avec les molécules à radical phénolique. Le premier exemple qui a été signalé est l'évolution des solutions de tyrosine [40].

b) *Le post-effet aboutit à des desmolyse.* — Voici deux expériences *in vitro*, toujours sur des solutions chimiques pures, mais où les solutions subissent une évolution vers la desmolyse, au cours des heures qui suivent l'irradiation. D'une part, Buther et Conway [4] irradient l'acide désoxyribonucléique et constatent que la viscosité et la biréfringence d'écoulement diminuent au cours des jours consécutifs à l'irradiation. D'autre part, Margaret Mac Donald [5] observe que la trypsine cristallisée perd son activité (à 25°) postérieurement à l'irradiation. Dans ces deux expériences, relatives à des protéides de poids moléculaire élevé, le post-effet aboutit à la desmolyse, tandis que les expériences précédentes, avec des molécules organiques de faible poids moléculaire, aboutissent à une action de synthèse.

Le rapprochement entre ces deux groupes d'expériences conduit à une constatation d'une importance capitale, à savoir que l'action des rayons X diffère essentiellement avec le poids moléculaire de la molécule irradiée : action de desmolyse pour les molécules complexes et de poids moléculaire élevé, action de condensation moléculaire et de synthèse pour les molécules simples et de faible poids moléculaire. Autrement dit, la radio-oxydation d'une petite molécule organique entraîne des effets tout à fait opposés à ceux de l'irradiation d'une grosse molécule complexe.

En réalité, l'action primaire consiste toujours, pour les deux cas, dans la même formation d'un radical peroxyde. Mais l'influence du poids moléculaire se manifeste au cours du post-effet, c'est-à-dire dans la façon où le radio-peroxyde va réagir :

a) Dans le cas d'une molécule organique de faible poids moléculaire, on a montré précédemment que cette molécule radio-peroxydée vient de subir, au cours de l'irradiation, son degré maximum d'oxydation : le radical peroxyde, ne pouvant plus agir sur sa propre molécule, est contraint d'agir sur une autre molécule, en effectuant une condensation moléculaire, c'est-à-dire une synthèse ;

b) Au contraire, dans le cas d'une molécule complexe et à poids moléculaire élevé, telle que l'acide désoxyribonucléique ou la trypsine étudiés par les auteurs précédents, le radical peroxyde, initialement et nécessairement localisé sur la périphérie de la molécule au cours de la première phase, peut induire dans sa propre molécule une oxydation progressive qui entraîne la desmolyse, les liaisons hydrogène et sulfhydryles étant alors les plus intéressées.

Il en résulte qu'il faut considérer désormais un mode tout à fait nouveau pour l'action des rayons X : à côté de leur action destructrice quand ils ont pour cible une grosse molécule ou un complexe de ces molécules tel qu'un gène, les rayons X deviennent un agent de synthèse quand ils agissent sur des petites molécules organiques. La combinaison de ces deux effets nous a permis, avec A. Lacassagne [6], d'envisager leur intervention possible dans la pathogénie des cancers provoqués par les rayons X : si le rythme de l'irradiation s'y prêtait, une première irradiation entraînerait la desmolyse d'une grosse molécule, tandis qu'une irradiation ultérieure pourrait effectuer, à l'intérieur même de la cellule, une synthèse avec les produits de cette desmolyse.

TABLEAU DE L'ACTION DES RAYONS X. — Nous avons maintenant tous les éléments pour dresser le tableau de l'action des rayons X, en distinguant les irradiations en solution aqueuse ou dans un solvant organique.

1° EN MILIEU AQUEUX, il suffit de distinguer, dans tous les cas, deux phases successives. La première, directement entraînée par le rayonnement, est la radio-oxydation primaire, phase constante puisque l'oxygène est toujours présent dans le milieu irradié (sauf conditions expérimentales spéciales dans lesquelles l'absence d'oxygène entraîne l'inefficacité de l'irradiation). La seconde phase consiste dans la réaction de ce radical peroxyde primaire, c'est-à-dire que : a) si la molécule irradiée est de faible poids moléculaire, le radical peroxyde est sans action possible sur la propre molécule qui le porte et doit nécessairement réagir avec une autre molécule : *c'est l'action de synthèse* ; b) si la molécule irradiée possède un poids moléculaire élevé, c'est-à-dire une dimension et une complexité notables, le radical peroxyde peut agir sur la propre molécule à laquelle il appartient : *c'est l'action de desmolyse*. Ce degré de complexité doit répondre à la seule condition que le radical peroxyde rencontre, sur la molécule qui le porte, un groupe susceptible d'être oxydé et situé à un écart maximum de 5 Å (rayon d'action moléculaire).

2° EN MILIEU ORGANIQUE, l'irradiation entraîne également un

effet constructeur quand elle porte — et seulement dans ce cas — sur des molécules simples. Magat et ses collaborateurs [7] ont montré que l'irradiation des monomères vinyliques entraîne leur polymérisation. Contrairement à ce qui se passe dans l'eau, cet effet est obtenu en l'absence d'oxygène ; il résulte de l'ouverture de la double liaison et n'entraîne pas de formation d'eau ni d'autres sous-produits.

En revanche, si l'on irradie maintenant le *polymère* vinylique — et, cette fois, la présence de l'oxygène est indispensable —, les rayons X exercent une action de desmolyse, mise en évidence par la chute de la viscosité.

Il est bien entendu que les rayons X peuvent agir de bien d'autres façons et qu'en milieu aqueux, notamment, on peut imaginer l'ouverture des doubles liaisons comparables à celles qui ont été signalées en milieu organique. Dans l'état actuel de la question, l'exposé précédent rend compte des faits expérimentaux. Cet exposé est résumé dans le tableau I :

TABLEAU I. — **Action des rayons X.**

En l'absence d'oxygène.		Aucun effet.
En milieu aqueux.	En présence d'oxygène.	<div> <div> <div>Action immédiate.</div> <div> 1° Activation de l'oxygène : $\frac{1}{2}O_2 + 2e \rightarrow O^-$ \downarrow 2° L'oxygène activé se fixe sur la molécule dissoute et la transforme en peroxyde. </div> </div> <div> <div>Action secondaire (post-effet).</div> <div> 1° Si la molécule est de faible poids moléculaire, le peroxyde la condense avec une autre molécule : <i>Action de synthèse.</i> 2° Si la molécule est de poids moléculaire élevé, le peroxyde oxyde sa propre molécule : <i>Action de desmolyse.</i> </div> </div> </div>
En milieu organique.	Monomère vinylique : condensation par ouverture des doubles liaisons.	
	Polymère vinylique. { <div> 1° En l'absence d'oxygène : aucune action. </div> <div> 2° En présence d'oxygène : desmolyse. </div>	

ASPECT THERMODYNAMIQUE DES RADIO-SYNTHÈSES. — En milieu aqueux et à la température ordinaire, certaines synthèses organiques par condensation de deux molécules avec élimination d'eau sont endothermiques : l'exemple le plus intéressant est la formation de la chaîne polypeptidique. Au contraire, cette synthèse devient spontanée avec les radio-peroxydes.

Comme l'a fait remarquer M. Magat, la synthèse avec les peroxydes est satisfaisante du point de vue de l'énergie d'activation. Tandis que la condensation de deux molécules, d'un phénol par exemple :



n'est pas spontanée en milieu aqueux, la réaction devient possible grâce à l'instabilité du radio-peroxyde. La seule différence avec la réaction précédente consiste en ce que la réaction libère cette fois une molécule d'eau oxygénée et non plus d'eau :



Il est évident que tout dépend de la formation initiale du peroxyde dans la première phase, au cours de laquelle les rayons X ont conféré à la molécule une sorte de stimulus de synthèse.

On peut encore remarquer que l'eau oxygénée est présente dans les cellules et qu'une synthèse de la chaîne polypeptidique par une intervention directe de peroxydes lèverait toute difficulté pour considérer cette synthèse, dans l'eau, directement avec les acides aminés.

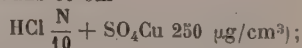
Quoi qu'il en soit, voici quelques exemples où les rayons X réalisent très simplement les synthèses de la chimie organique.

EXEMPLES DE SYNTHÈSES RÉALISÉES AVEC LES RAYONS X. — L'action de synthèse des rayons X peut être mise en évidence très simplement en s'adressant à des matières colorantes faciles à identifier et à doser au photo-colorimètre. Il existe en effet de nombreuses matières colorantes dont la synthèse chimique exige l'intervention d'un oxydant (acide arsénique, chlorure ferrique, etc.). L'irradiation directe du mélange des constituants aboutit à la même synthèse. L'expérience permet de distinguer deux groupes de colorants : pour les uns (fuchsine, vert malachite, violet de Lauth, jaune d'acridine), le radio-peroxyde agit au cours même de l'irradiation. La comparaison avec le témoin doit être faite immédiatement après l'irradiation ; car, si l'on chauffe, la coloration augmente très fortement dans l'essai irradié ; mais elle se développe en même temps chez le témoin d'une façon plus ou moins marquée, ce qui rendrait alors moins évidente l'action des rayons X.

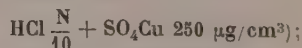
Au contraire, pour d'autres matières colorantes (dont les principaux représentants sont le bleu de méthylène et le noir d'aniline), la synthèse du colorant exige les deux étapes successives : a) l'irradiation ; b) le chauffage. Au cours de ce chauffage, le colorant apparaît d'une façon intense, tandis que le témoin, chauffé mais non irradié, reste incolore : ce qui rend l'expérience très démonstrative.

Fuchsine. — On administre, avec barbotage d'oxygène, 750 000 r au mélange :

1 cm³ de para-toluidine HCl (725 mg en solution dans 50 cm³



1 cm³ d'ortho-toluidine HCl (700 mg en solution dans 500 cm³

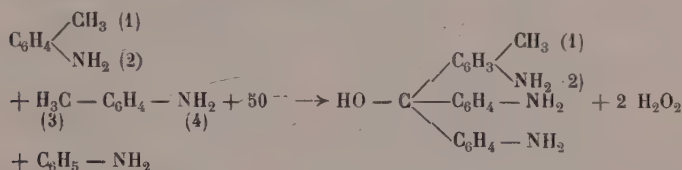


1 cm³ d'aniline HCl (650 mg en solution dans 50 cm³ HCl + SO₄Cu 250 μg/cm³).

Les solutions sont toujours traitées au noir végétal.

Le témoin est incolore, tandis que l'essai irradié a viré au rose mauve.

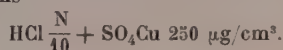
Le schéma de la radio-réaction est :



En chimie organique, la condensation est obtenue par l'action oxydante de l'acide arsénique.

Vert malachite. — On administre, avec barbotage d'oxygène, 750 000 r au mélange :

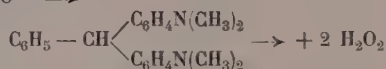
1,5 cm³ aldéhyde benzoïque en solution saturée dans



1,5 cm³ diméthylaniline (0,8 cm³ dans 50 cm³ HCl $\frac{\text{N}}{10}$ + SO₄Cu 250 $\mu\text{g/cm}^3$).

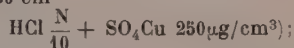
Le témoin reste incolore, tandis que l'essai irradié vire au vert léger. La réaction est fugace.

Le schéma de la radio-réaction est :



Violet de Lauth. — On administre, avec barbotage d'oxygène, 750 000 r au mélange :

2,5 cm³ p. phénylène diamine, HCl (750 mg dans 50 cm³



2,5 cm³ de la solution de 0,5 cm³ (NH₄)₂S dans 50 cm³



On filtre l'excès de sulfure de cuivre qui précipite.

Le témoin est d'un mauve très léger, tandis que l'essai irradié tire au violet foncé.

Le schéma de la radio-réaction (2) est :

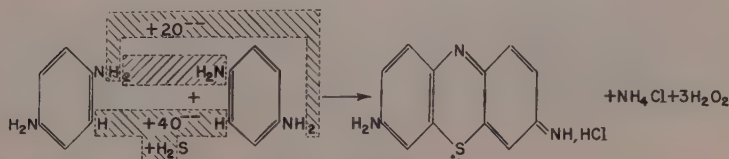


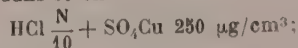
SCHÉMA 1.

(2) Je remercie M. R. Royer qui a bien voulu établir le schéma de cette réaction.

En chimie organique, l'oxydation est réalisée par F_2Cl_6 .

Jaune d'acridine. — On administre, avec barbotage d'oxygène, 750 000 r au mélange :

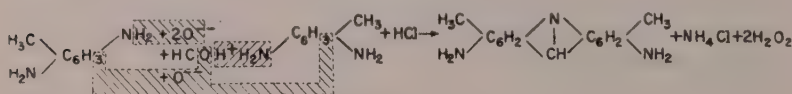
2,5 méta-toluyène diamine, HCl (800 mg dissous dans 50 cm^3



2,5 cm^3 d'une solution au 1/50 de formol commercial.

Le témoin est légèrement jaune, tandis que l'essai irradié vire au brun foncé.

Le schéma de la radio-réaction est :

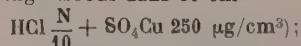


SCHEMA 2.

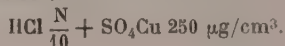
L'oxydation est réalisée, en chimie organique, par Fe_2Cl_6 .

Bleu de méthylène. — Cette radio-synthèse constitue la manifestation la plus spectaculaire et la plus sensible des propriétés synthétisantes des rayons X. On administre d'abord, avec barbotage d'oxygène, 100 000 r au mélange :

1,5 cm^3 diméthyl p. phénylène diamine, HCl (850 mg dissous dans 50 cm^3



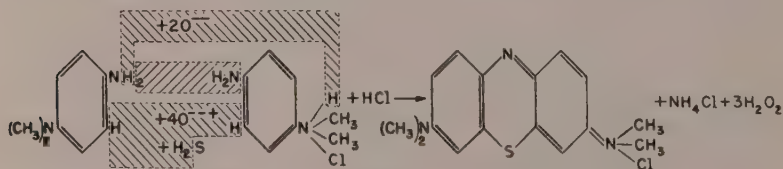
1,5 cm^3 de la solution filtrée de (0,5 cm^3 NH_4) $_2$ S dans 50 cm^3



Après l'irradiation, on chauffe pendant quinze minutes à 100° en ampoule scellée.

Le témoin, chauffé mais non irradié, reste incolore, tandis que la solution, déjà traitée par les rayons X, se transforme en une magnifique solution bleu très foncé de bleu de méthylène.

Le schéma de la radio-réaction est :



SCHEMA 3.

Pour une dose comprise entre 100 000 r et 500 000 r, la radioformation de bleu de méthylène est proportionnelle à la dose de rayons X. Si cette dose est encore augmentée (entre 500 000 et

750 000 r), la solution vire progressivement au mauve foncé, par suite de la déméthylation consécutive à la radio-oxydation, et le bleu de méthylène est transformé en violet de Lauth.

Noir d'aniline. — On sait que l'aniline, chauffée en présence d'un oxydant, se transforme en une matière colorante noire. On obtient, très facilement avec les rayons X, des produits de condensation de plus en plus colorés. La solution de chlorhydrate d'aniline (1 400 mg dans 50 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ + vanadate de Na

250 µg/cm³) reçoit 500 000 r, sous barbotage d'oxygène, puis est chauffée à 100° pendant quinze minutes. La solution devient jaune brun.

Cette même solution, soumise à nouveau aux rayons X et au chauffage, devient brun foncé. Avec un troisième cycle, la coloration passe au brun noir, tandis que les témoins, qui accompagnent les trois séries d'expériences et qui ont subi les mêmes chauffages, sont restés incolores.

III. — SYNTHÈSES CHIMIQUES RÉALISÉES

PAR LES RAYONS ULTRA-VIOLETS ET PAR LES ULTRA-SONS.

De même que les rayons X, les rayons ultra-violetts activent l'oxygène ; les propriétés oxydantes de ce rayonnement sont d'ailleurs utilisées depuis longtemps. Il est donc normal de retrouver ici un pouvoir synthétisant analogue à celui des rayons X et avec un mécanisme identique, exigeant à la fois, d'une part, que les U.-V. agissent en présence de l'oxygène et, d'autre part, que la molécule organique traitée possède un faible poids moléculaire.

La source de rayons U.-V. est constituée par une lampe Mazda 300, placée à 2 cm de la surface de la solution traitée. On irradie chaque fois un volume de 20 cm³ dans une cupule plate où la solution occupe une profondeur de 1 cm environ. On opère toujours avec un barbotage d'oxygène. La chaleur dégagée par l'ampoule entraîne l'échauffement de la solution (50-53° après trente minutes).

Voici, comme précédemment, la synthèse de matières colorantes. Il convient de rappeler que certaines formations analogues ont été déjà signalées, mais sans avoir été rattachées à une action générale de synthèse.

Bleu d'indophénol. — On irradie, pendant vingt minutes, sous barbotage d'oxygène, le mélange :

10 cm³ de α -naphтол (250 mg dans 50 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ + SO₄Cu 250 µg/cm³;

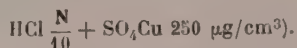
10 cm³ de diméthylparaphénylène-diamine, HCl (850 mg dans 50 cm³

HCl $\frac{N}{10}$ + SO₄Cu 250 µg/cm³).

On observe, à la fin de l'irradiation, de belles aiguilles de bleu d'indophénol, solubles en bleu en milieu alcalin.

Bleu de toluyène. — On irradie, pendant vingt minutes, sous barbotage d'oxygène, le mélange :

10 cm³ de diméthylparaphénylène-diamine, HCl (solution déjà décrite);
10 cm³ de métatoluyène-diamine, HCl (800 mg dans 50 cm³



Au cours de l'irradiation, la solution se transforme en bleu de toluyène.

Fuchsine. — La fuchsine se forme en irradiant un mélange identique à celui qui a été décrit précédemment à propos de l'action des rayons X.

Les *ultra-sons* activent l'oxygène d'une façon moins intense que les rayons X et U.-V., mais bien mise en évidence par Schmitt, Johnson et Olson [8]. Cet effet oxydasique a été proposé pour expliquer leur mode d'action [9].

Le pouvoir synthétisant des *ultra-sons* est moins marqué que celui des agents physiques précédents, mais il est incontestable et peut être mis facilement en évidence.

Le mélange de *p*.phénylène-diamine et de H₂S, en présence d'acide chlorhydrique et de cuivre, se condense en violet de Lauth, mais en donnant une faible coloration mauve, bien moins intense que les précédentes.

De même, le mélange de diméthyl-*p*.phénylène-diamine et de H₂S, soumis aux U. S. pendant dix minutes et porté à l'ébullition, vire au rouge vineux, mais sans parvenir à la synthèse du bleu de méthylène.

On peut maintenant établir la comparaison entre les agents physiques peroxydants qui ont été expérimentés ici. Deux facteurs interviennent : d'une part, la pénétration et l'absorption de l'agent physique dans la masse de la solution traitée et, d'autre part, l'activation de l'oxygène.

La transmission des *ultra-sons* dans l'eau est très satisfaisante, mais leur mode d'activation de l'oxygène est d'origine purement mécanique, c'est-à-dire médiocre.

L'activation de l'oxygène par les U.-V. est intense, mais leur pénétration dans la masse liquide est très faible.

Enfin, les rayons X activent l'oxygène et pénètrent dans la solution en fonction de leur longueur d'onde.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

L'intervention de l'oxygène en radiobiologie se révèle particulièrement importante, Après avoir expliqué l'action de desmolyse des rayons X, cette même intervention permet de démontrer maintenant un mode nouveau de l'action des rayons X : leur pouvoir de synthèse.

D'autre part, cette action de synthèse est partagée par d'autres agents physiques peroxydasiques : les rayons ultra-violets et les ultra-sons.

Cette action synthétisante peut être retenue pour expliquer la biosynthèse avec les rayonnements ultra-violets et cosmiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. LOISELEUR. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1001.
- [2] A. B. LEXNER et T. B. FITZPATRICK. *Physiol. Rev.*, 1950, **30**, 91.
- [3] M. POLONOVSKI et G. SCHAPIRA. *Pathologie chimique*, Paris, 1952, 716.
- [4] J. A. V. BUTHER et B. E. CONWAY. *J. chem. Soc.*, 1950, 3418 ; 1952, 834.
- [5] Margaret R. MAC DONALD. *Faraday Soc.*, décembre 1952, 7542.
- [6] A. LACASSAGNE et J. LOISELEUR. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 417.
- [7] M. MAGAT, A. CHAPIRO, Y. LANDLER et Ch. COUSIN. *Rev. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1949, **68**, 1037. — A. CHAPIRO. *J. Chim. Phys.*, 1950, **47**, 747 et 764.
- [8] F. O. SCHMITT, C. H. JOHNSON et A. R. OLSON. *J. Am. Chem. Soc.*, 1929, **51**, 370.
- [9] J. LOISELEUR. *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **218**, 879 ; 1953, **236**, 918.
- [10] J. LOISELEUR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **45**, 1.

DESCRIPTION
DE SABOURAUDITES PRAECOX NOVA SPECIES
SUIVIE DE REMARQUES SUR LE GENRE
SABOURAUDITES

par E. RIVALIER (*).

(Laboratoire Sabouraud.
Clinique dermatologique de l'Hôpital Saint-Louis.)

L'apparition d'une espèce nouvelle de dermatophyte risque d'être accueillie avec peu de faveur si l'on songe à l'encombrement qui règne dans la nomenclature de ces parasites. Sabouraud s'était arrêté à une cinquantaine d'espèces (ou variétés fixées), mais après lui les descriptions se multiplièrent et un catalogue complet en contiendrait aujourd'hui des centaines. Langeron, sabrant sans ménagement ce buisson touffu, a écrit que le nombre d'espèces dûment établies ne devait pas dépasser une vingtaine. Il fut peut-être un peu trop sévère tout en nous rapprochant cependant de la vérité. L'espèce que je présente ayant été rencontrée une seule fois, il était dans mes intentions de n'en faire état qu'après l'avoir rencontrée à nouveau. Mon attente fut vaine, mais je crois cependant nécessaire de faire connaître son existence en raison de la stabilité de ses caractères macroscopiques et microscopiques qui se sont maintenus sans nulle altération depuis dix ans.

Le malade était un homme de 42 ans, atteint d'une plaque d'herpès circiné d'un poignet criblée de vésicules suppuratives, mais sans caractères cliniques particuliers et dont l'étiologie est demeurée inconnue. Le parasite, se comportant en épidermophyte, fut retrouvé dans l'épiderme soulevé des vésicules, mais non dans les poils. Sa culture, facilement obtenue à partir du pus des vésicules, s'avéra aussitôt tout à fait particulière.

Précocement développée et rapidement extensive, ce qui justifie le nom de *præcox*, cette culture, sur milieu d'épreuve de Sabouraud glycosé ou maltosé, apparaît d'abord sous l'aspect d'un disque blanc et ras de duvet court, centré par une minime

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} novembre 1953.

saillie ; rapidement, la partie centrale prend une teinte chamois clair et un aspect très finement pulvérulent, tandis que le revers de la culture prend une teinte jaune orangé. Sur boîte de Roux permettant un large développement, le thalle atteint en quatre semaines un diamètre de 10 cm, dépassant ainsi en rapidité de pousse les espèces les plus florides (fig. 1). C'est alors un large disque plat de teinte chamois clair très finement granuleux et dont la périphérie seule demeure blanche et très finement duveteuse, sans jamais présenter de rayons gladiolés ; l'apparition de bouquets de dégénérescence pléomorphe en quelques points

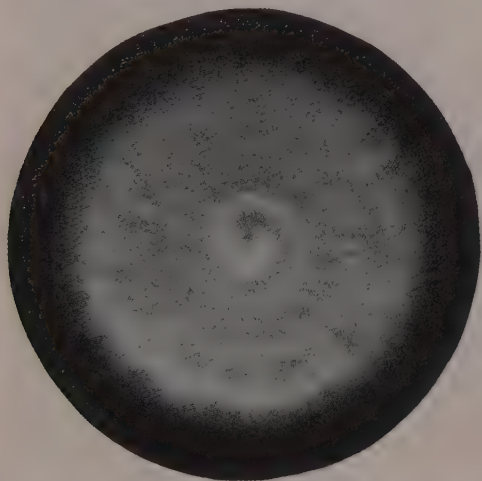


FIG. 1. — *Sabouraudites praecox* nov. Culture de dix-huit jours sur milieu d'épreuves de Sabouraud glucosé. 4/5 de la grandeur naturelle.

de ce disque est fréquente, mais toujours assez tardive. Sur milieu de conservation la culture est de même teinte, mais bien moins rapidement extensive et présente, quand elle vieillit, des anneaux concentriques alternativement plus minces et plus épais (fig. 2). Ces différents caractères permettent de distinguer facilement la nouvelle espèce de *Sabouraudites gypseus* Bodin, à qui elle ressemble le plus. Elle en a la teinte chamois, quoique d'un ton moins accusé et moins chaud ; sa texture est beaucoup plus fine et surtout les rayons gladiolés en éclaboussure de plâtre, si caractéristiques de *S. gypseus*, manquent ici complètement.

Néanmoins, ces éléments de diagnose pourraient sembler un peu légers à quiconque est familier des champignons des teignes et en connaît les nombreuses mutations possibles, si l'examen microscopique ne venait apporter des arguments irréfutables en

faveur de la validité de l'espèce. Dissociée et examinée extemporanément dans le lactophénol, une parcelle de la pulvérulence de la culture montre une quantité considérable de fuseaux multiloculés ou macroconidies caractéristiques du genre *Sabouraudites*, mais doués de caractères tout à fait spéciaux et qu'une culture sur lame gélosée, fixée et colorée, permet d'étudier en détail. Portés comme les fleurs d'une inflorescence lâche sur de longues hyphes grêles et rameuses, ces fuseaux sont terminaux, quelques-uns latéraux et sessiles et d'aspect bifurqué à leur



FIG. 2. — *Sabouraudites praecox* nov. Culture de soixante jours sur milieu de conservation de Sabouraud. 4/5 de la grandeur naturelle.

base (fig. 3). Remarquables par leur étroitesse et leur longueur, d'un aspect lancéolé et aussi profondément différents de ceux de *Sabouraudites gypseus* que de ceux de *Sabouraudites canis* (fig. 4 et 5), ces fuseaux mesurent 60 à 65 microns de longueur sur 9 de largeur dans leur partie centrale ; la courbure de leurs bords est uniforme et leurs extrémités sont régulièrement acuminées et nullement étirées ; ils sont divisés en 6 à 9 loges séparées par des cloisons cellulosiques épaisses et criblées de petites verrucosités comme chez les autres espèces du genre. De même, ainsi qu'on l'observe chez celles-ci, les cloisons qui séparent les loges soulèvent légèrement la paroi externe en cannelures circulaires, évoquant l'aspect de certaines larves d'insectes (pl. I, fig. 1). Il ne s'agit pas là d'un artifice de préparation tel que pourrait le réaliser la déshydratation car les fuseaux se présentent ainsi

lorsqu'on examine la culture vivante au microscope. Ajoutons que, sur les cultures pratiquées sur milieux ordinaires, il n'a pas été vu d'aleuries, ainsi qu'on en observe toujours, et parfois en grande abondance, chez les autres *Sabouraudites* fertiles.

L'espèce ainsi définie paraît très rare car je n'ai pas connaissance qu'elle ait été décrite, et, en de nombreuses années je ne l'ai rencontrée qu'une fois ; elle est d'une remarquable robustesse, inclinant à penser qu'elle est récemment issue du milieu naturel. Les multiples repiquages pratiqués depuis dix ans n'ont

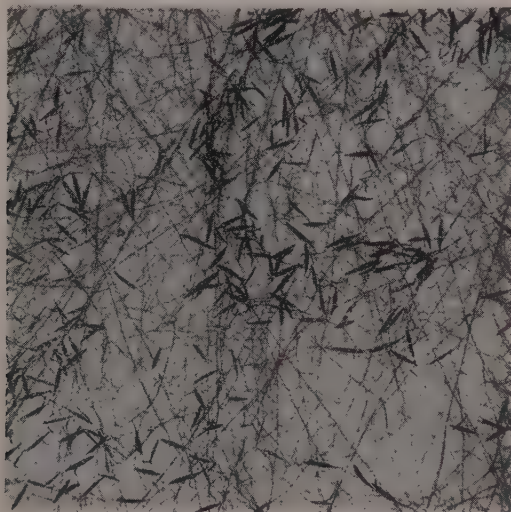


FIG. 3. — *Sabouraudites praecox* nov. Culture sur lame gélosée, $\times 60$.

pas altéré si peu que ce soit ses caractères tant macroscopiques que microscopiques. Les essais d'inoculation pratiqués à plusieurs reprises sur la peau du cobaye n'ont déterminé aucune infestation épidermique ni pileaire, quel que soit le procédé employé : introduction du mycélium dans l'épiderme par piqure ou application d'une pâte virulente sur la peau tondu et scarifiée.

La forme très particulière et d'une absolue stabilité des macroconidies de l'espèce décrite incite à examiner comparativement les mêmes organes des autres *Sabouraudites* et cet examen montre de constantes et considérables différences sur lesquelles il ne semble pas qu'on ait mis suffisamment l'accent et que les microphotographies jointes à cet article exprimeront sans doute mieux que des descriptions et des chiffres. Ces mêmes micropho-

tographies montreront aussi les aleuries très variables en abondance, absentes ou portées sur des hyphes grêles ou innombrables



FIG. 4. — *Sabouraudites canis* Bodin. Culture sur lame gélosée, $\times 60$.



FIG. 5. — *Sabouraudites gypseus* Bodin. Culture sur lame gélosée, $\times 60$.

sur des buissons rameux ; elles sont constamment pyriformes.
Je connais actuellement quatre types parfaitement caractérisés

de fuseaux de *Sabouraudites* : le type *praecox* déjà décrit, le type *gypseus*, le type *canis* et le type *gallinae*.

Chez *Sabouraudites gypseus* Bodin (ancien *Achorion gypseum* de Bodin) les fuseaux (pl. I, fig. 3), très nombreux, sont courts, en petits tonnelets fortement cannelés circulairement ; ils mesurent en moyenne 36×12 microns, leurs extrémités ne sont nullement étirées et leur aspect est si caractéristique qu'il fait reconnaître l'espèce sans nul autre examen ; ils sont accompagnés d'un nombre médiocre d'aleuries disposées en simples épis ou en grappes lâches ; *gypseus* est, comme *praecox*, une espèce très robuste se conservant très longtemps à travers de multiples repiquages.

Chez *Sabouraudites canis* Bodin (*Microsporum lanosum* de Sabouraud, *Microsporum felineum* de Colcott Fox) les fuseaux nous apparaissent énormes et ventrus (pl. I, fig. 2), de dimensions plus que doubles de celles de la précédente espèce, en moyenne 75×18 microns ; en outre leurs extrémités sont atténuées et étirées comme les pointes d'un citron, ce qui leur donne une physionomie particulière et caractéristique. Les aleuries pyriformes sont assez peu nombreuses et portées sur des hyphes simples ou à peine rameuses. Au contraire, des deux précédentes, cette espèce est très fragile. L'aspect macroscopique des cultures, si remarquable au début, s'altère rapidement et les organes de fructification tendent à se raréfier et à disparaître quand la souche a subi de nombreux repiquages.

Sabouraudites gallinae Mégnin nous offre un aspect bien différent, car ses fuseaux, peu acuminés à leur base et tout à fait obtus à leur extrémité, ont une forme assez voisine de celle des fuseaux de *Ctenomyces* (pl. I, fig. 6). Cependant l'épaisse paroi cellulósique de leurs loges et les longs pédicules grêles au bout desquels ils sont appendus ne laissent pas le moindre doute sur la position systématique de l'espèce. Ces fuseaux mesurent en moyenne 40×10 microns ; ils sont accompagnés d'un nombre généralement assez médiocre d'aleuries piriformes disposées en épis lâches ou en petites grappes. *Sabouraudites gallinae* est également une espèce fragile dont les souches deviennent ordinairement tout à fait stériles quand elles ont été repiquées à de multiples reprises.

En se basant sur les quatre types de macroconidies qui viennent d'être décrits, on peut aisément classer les espèces de *Sabouraudites* que nous connaissons. C'est ainsi que, auprès de *gypseus* Bodin, se placent naturellement *fulvus* Uriburu et *dubosi* Vanbreuseghem.

S. fulvus n'est, à ma connaissance, représenté que par la souche originale de son auteur qui figure dans la collection Sabouraud et n'a rien perdu de ses caractères botaniques. La validité de l'espèce a été contestée, car elle ressemble beaucoup à *gypseus*,

à la différence importante près que ses cultures ne présentent pas les rayons gladiolés caractéristiques de ce dernier ; ses fuseaux sont aussi notablement moins épais que ceux de *gypseus* et mesurent en moyenne 34×8 microns (pl. I, fig. 4). Si l'on tient compte du fait que Uriburu a isolé cette espèce d'une microsporidie et que jamais personne n'a vu *S. gypseus* engendrer une teigne microsporidique, j'ai tendance à croire que *fulvus* est une espèce valable.

S. duboisi donne des fuseaux très analogues, mesurant en moyenne 35×8 microns (pl. I, fig. 5), mais il est remarquable par l'abondance considérable des grappes d'aleuries qui avait pu faire croire à Langeron que ce champignon était un *Clenomyces*. C'est une espèce d'origine africaine dont il n'existe, à ma connaissance, qu'une seule souche isolée par Vanbreuseghem. Ses cultures épaisses et feutrées avec une auréole de rayons gladiolés sont caractéristiques et la validité de l'espèce n'est pas discutable.

Après de *S. canis* vient se ranger *S. audouini*, espèce la plus répandue de toutes et la plus connue puisqu'elle est l'agent exclusif en Europe et en Amérique du Nord des épidémies scolaires de teigne microsporidique. Et combien, cependant, les deux espèces sont de prime abord distinctes ! Chez *canis*, pullulation de fuseaux réguliers et égaux entre eux, chez *audouini*, fuseaux rares, apparaissant seulement — et pas toujours — dans les vieilles cultures et presque toujours mal formés. Ils sont grands, mesurant 60 à 75μ de longueur \times 15 à 20μ de largeur ; certains reproduisent très exactement le type *canis*, mais la plupart sont irréguliers, à loges inégales, bossués, tordus, cintrés, parfois bifurqués ou soudés bout à bout en constituant un immense fuseau étranglé. Il est impossible de ne pas voir dans toutes ces anomalies un stigmate dégénératif précédant la dégénérescence finale caractérisée par la disparition de toute fructification. Il en est constamment ainsi chez les souches de *S. audouini* qui ont été longtemps repiquées et il est fréquent de rencontrer des souches récemment isolées chez lesquelles on trouve tout au plus quelques aleuries et pas du tout de fuseaux. Pareille dégénérescence ne saurait surprendre chez une espèce acclimatée à l'espèce humaine et habituée depuis longtemps à la vie parasitaire au contraire des précédentes, issues depuis peu du milieu naturel. C'est un exemple entre mille du phénomène de la dégradation parasitaire, bien connu de quiconque est familier avec la botanique ou la zoologie.

Après de *S. gallinae* semble se placer *S. quinckeanus* Bodin, agent du favus spontané de la souris, mais la place de cette espèce a été récemment contestée par Vanbreuseghem qui en fait un *Trichophyton*. Faute d'un matériel d'étude suffisant, je ne saurais avoir sur ce sujet une opinion personnelle ; je la laisserai donc de côté.

Cet aperçu ne représente d'ailleurs pas une révision du genre *Sabouraudites*, dont je n'ai fait que nommer les espèces essentielles ; mon but est de montrer la précision des caractères botaniques des macroconidies qui permettent de séparer avec la plus grande certitude les espèces du genre, au moins les principales. Il y a là une grande différence avec les *Ctenomyces*, pour lesquels le microscope ne nous donne que des caractères génériques. On comprend aisément l'incertitude qui s'attache aux espèces de ce genre macroscopiquement pourtant aussi distinctes entre elles que les *Sabouraudites*. Selon la tendance des mycologues qui les étudient, il y a place pour toutes les manières de voir entre le pluralisme probablement excessif de Sabouraud et l'unicisme total d'Emmons, vraisemblablement inexact.

Mais, revenant aux *Sabouraudites*, je ne saurais terminer ces remarques sans parler d'un parasite fort discuté, l'ancien *Microsporium ferrugineum* de Ota, au sujet duquel j'ai bataillé jadis oralement, et en toute amitié avec notre regretté Maurice Langeron qui en faisait un *Trichophyton* ; je demeure aujourd'hui profondément convaincu de l'inexactitude de cette manière de voir et range ce parasite dans le genre *Sabouraudites* dont il représente l'espèce la plus dégradée. On sait que ce parasite, agent de la teigne microsporique en Extrême-Orient, est caractérisé par l'habituelle teinte jaune de rouille de ses cultures — infiniment polymorphes d'ailleurs — et par l'absence de toute fructification. Une fois, Langeron a pu observer chez lui quelques rares aleuries, mais personne n'a jamais vu ses macroconidies, et ce sont ces organes qui sont caractéristiques du genre.

Passer outre au caractère essentiel peut paraître botaniquement absurde, mais il est plus fâcheux, à mon sens, de faire état d'un caractère négatif pour rapprocher les parasites les plus divers n'ayant de commun que cette infirmité sans essayer d'en entrevoir la cause. Tous les dermatophytes étant évidemment parents, et les plus évolués d'entre eux étant dotés de riches fructifications, il tombe sous le sens que ceux d'entre eux qui sont inaptes à en produire sont des formes dégénératives, dégradées par un long parasitisme. *Trichophyton violaceum*, parasite dégradé, donne lieu à des cultures presque toujours glabres et stériles ; je l'ai vu cependant deux fois sous mes yeux donner naissance à une mutation fertile riche en aleuries et en fuseaux et parfaitement identique à une culture de *Trichophyton rubrum*. Chacun admet, et à juste titre, qu'on réunisse dans le genre *Trichophyton* des champignons fertiles et des champignons stériles. Pareil rapprochement n'a rien de plus choquant dans le genre *Sabouraudites*, d'autant mieux qu'une espèce, *S. audouini*, nous montre avec évidence, ainsi qu'on l'a vu plus haut, tous les passages de la souche fertile à la souche stérile.

À proprement parler, *S. ferrugineus* est inclassable mais, parmi

ses nombreuses formes, il en existe qui constituent un passage insensible vers *S. audouini* et, par ailleurs, il pousse dans le cheveu selon le type microsporique, caractère botanique de seconde valeur, mais caractère botanique tout de même. Pour ces raisons il est — non démontré certes — mais infiniment probable que *S. ferrugineus* est bien un *Sabouraudites*. J'incline même à croire que *S. audouini* et *S. ferrugineus* sont deux formes adaptatives issues d'une souche commune qui est peut-être *Sabouraudites canis*.

Ainsi le problème des cultures glabres dont on a tant parlé m'apparaît comme une difficulté artificiellement créée. Ces cultures réduites à un mycélium stérile n'ont pas lieu de nous étonner plus que les dégénérescences stériles glabres ou duveteuses d'espèces normalement fertiles et que nous voyons chaque jour se produire sous nos yeux à la suite de repiquages successifs sur milieux sucrés. Elles démontrent seulement que la vie parasitaire peut engendrer à la longue des résultats analogues à ceux de la végétation sur nos milieux artificiels trop riches.

En présence d'une culture stérile, il y a donc lieu de chercher par tous les moyens à lui faire produire des fructifications qui révéleront sa véritable identité, et si l'on n'y peut parvenir, à lui trouver une place probable dans la systématique en s'appuyant, faute des caractères essentiels, sur des caractères secondaires, tels que sa physionomie dans la vie parasitaire et ses propriétés physiopathologiques. L'erreur que l'on risque de commettre ainsi est beaucoup moins grave que de rejeter le parasite dans un groupement de rebut, vide de toute signification, ce qui est manière d'agir simpliste et parfaitement antiscientifique.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I

FIG. 1. — *Sabouraudites praecox* n. sp.

FIG. 2. — *Sabouraudites canis* Bodin.

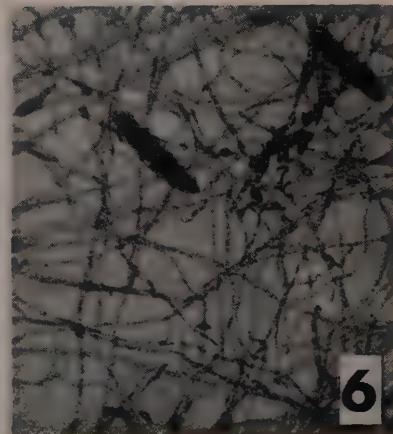
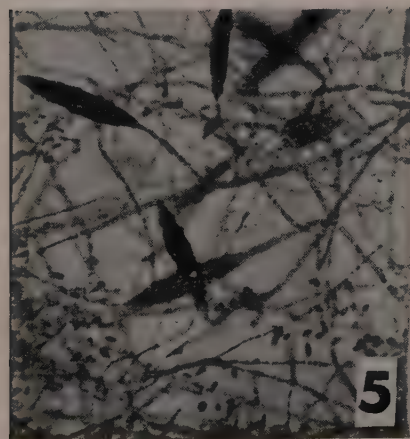
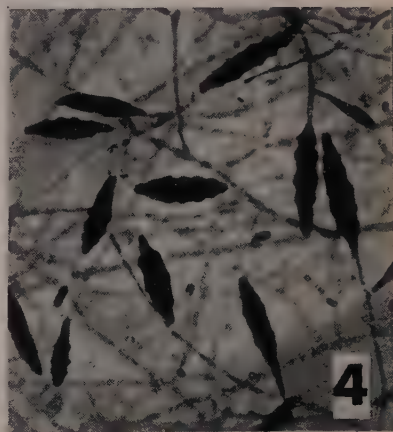
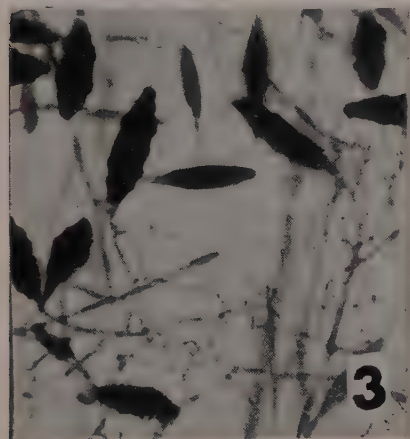
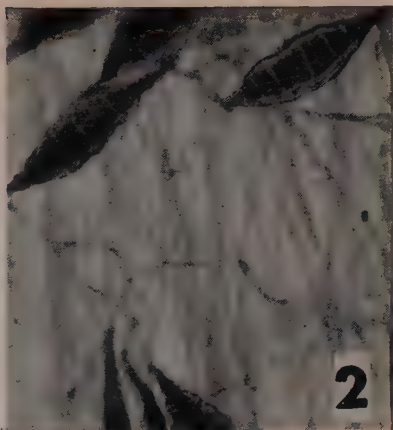
FIG. 3. — *Sabouraudites gypseus* Bodin.

FIG. 4. — *Sabouraudites fulvus* Uriburu.

FIG. 5. — *Sabouraudites duboisi* VAN REUSEGHEM.

FIG. 6. — *Sabouraudites gallinæ* Mégnin.

Cultures sur lames gélosées, $\times 380$.



ANOMALIES OBSERVÉES AU COURS DU TITRAGE DES SÉRUMS ANTI-ŒDEMATIENS

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY (*).

(Institut Pasteur.)

Pour évaluer le pouvoir antitoxique des sérums anti-œdématisiens de type A destinés à l'usage thérapeutique, nous nous servons toujours de toxine œdématisiens homologue élaborée par la souche Delombe dans du bouillon Vf [4], précipitée par le sulfate neutre d'ammonium, desséchée et titrée. Au cours des différents dosages, nous employons de l'eau physiologique pour dissoudre la toxine et diluer les sérums. Les différents liquides à titrer (toxine et sérums) sont injectés par voie sous-cutanée à des souris blanches de 17 à 20 g ; les animaux inoculés sont observés pendant trois jours.

a) DOSE MINIMA MORTELLE ET DOSE L + DE LA TOXINE œdématisiens. — La préparation de toxine œdématisiens précipitée que nous avons utilisée au cours du présent travail est étiquetée OE10. La dose minima mortelle (DMm) de cette préparation est égale à 0,0038 mg : ce poids de toxine tue 50 p. 100 des souris injectées. Une unité antitoxique de sérum étalon anti-œdématisiens (1), c'est-à-dire une unité internationale (U. I.) anti-œdématisiens neutralise 5 mg de la toxine OE10 : la moitié des souris qui reçoivent, sous le volume de 0,5 ml, en injection sous-cutanée, une U. I. + 5 mg de toxine survivent. Un dixième d'unité antitoxique de ce même étalon neutralise expérimentalement 0,5 mg de toxine OE10, soit 10 fois moins qu'une unité antitoxique : en effet, la moitié des souris qui reçoivent (sous le volume de 0,5 ml) 0,1 U. I. + 0,5 mg de toxine survivent. Donc la dose L + de la toxine OE10 est égale à 5 mg et représente 1 315 DMm pour la souris ; le dixième de la dose L + de la même toxine est égal à 0,5 mg et représente 131 DMm.

b) PRINCIPE DU TITRAGE DES SÉRUMS ANTI-œdématisiens. — Pour déterminer le titre antitoxique d'un sérum anti-œdématisiens,

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 novembre 1953.

(1) L'étalon anti-œdématisiens est conservé à l'état sec à Londres et à Copenhague, et délivré en solution glycérinée.

nous procédons ainsi : à des volumes variables de sérum, nous ajoutons une quantité fixe de toxine OE 10 ; les mélanges sont amenés au même volume par addition d'eau physiologique, laissés pendant quarante-cinq minutes à 37°, puis injectés comme nous l'avons dit précédemment. Chaque mélange est préparé en quantité suffisamment grande pour avoir la possibilité d'injecter 4 souris (0,5 ml par souris). Les mélanges (sérum + toxine) qui sont inoffensifs pour la souris contiennent évidemment un excès de sérum ; ceux qui tuent toutes les souris inoculées sont déficients en antitoxine ; celui qui laisse survivre la moitié des souris indique d'une manière précise le titre de sérum examiné.

c) SÉRUMS ANTI-œdématisiens ÉTUDIÉS. — Nos titrages portent sur des sérums anti-œdématisiens d'aspect normal provenant de chevaux ou de mulets. Les animaux donneurs sont immunisés dans nos conditions habituelles et saignés deux fois par mois à quatre jours d'intervalle ; volume de sang prélevé à chaque saignée : 6 à 7 litres. Le sérum qui exsude du caillot sanguin est siphonné le lendemain des saignées. Nous recevons immédiatement un échantillon du sérum issu de la première saignée mensuelle faite à chacun des animaux ; la recherche de l'activité antitoxique de chaque échantillon est commencée aussitôt.

Les mêmes sérums sont titrés après une heure de chauffage à 56°. Certains d'entre eux sont retitrés après cinq mois de conservation à la température ambiante (22-24°).

SÉRUMS ANTI-œdématisiens FRAÎCHEMENT PRÉLEVÉS, NON CHAUFFÉS.

Pour titrer ces immunosérums, nous avons employé comme doses d'épreuve de toxine œdématisiens, la dose L+ et le dixième de la dose L+ de la toxine OE 10, c'est-à-dire 5 mg et 0,5 mg de cette toxine. Dans la plupart des titrages, nous avons précisé :

a) Le plus petit volume de sérum fraîchement prélevé qu'il faut ajouter à la dose L+ de la toxine OE 10 (5 mg) pour obtenir la survie de la moitié des souris qui reçoivent un tel mélange sous la peau ; conventionnellement, l'inverse de ce volume indique le nombre d'unités internationales anti-œdématisiens contenues dans 1 ml de sérum (par exemple, si 1/1 500 ml de sérum protège la moitié des souris, on dit que le sérum contient 1 500 U. I. anti-œdématisiens par millilitre).

b) Le plus petit volume de sérum fraîchement prélevé qui, ajouté au dixième de la dose L+ de la toxine OE 10 (0,5 mg), permet la survie de la moitié des souris injectées ; l'inverse de ce volume indiquera, en unités provisoires (u. p.), l'activité antitoxique de 1 ml de sérum.

Dans un certain nombre de titrages, nous avons seulement déterminé le volume de sérum qui protège toutes les souris injectées et le volume légèrement inférieur qui n'en protège aucune ; la dose intermédiaire du sérum, qui aurait permis la survie de la moitié environ des souris, n'a pu être recherchée, faute de souris de poids réglementaire.

Le premier titrage (effectué le lendemain des saignées) indique approximativement le pouvoir antitoxique des sérums ; pour déterminer d'une manière suffisamment précise le titre de ceux-ci, plusieurs autres essais sont généralement nécessaires : ces nouvelles déterminations sont presque toujours terminées neuf à douze jours après le dosage préliminaire. Nous indiquons dans le tableau I les résultats du titrage de 11 sérums anti-œdématisiens ainsi que le temps pendant lequel chaque animal donneur a reçu des injections d'anatoxine *œdématisiens* avant le prélèvement du sérum étudié.

Les sérums 632, 679 *a*, 679 *b*, 382, 383, 628 et 699 sont fournis par des chevaux et les sérums 937 *a*, 963 *a* et 963 *c* par des mulets. Avant le prélèvement des sérums dont nous mentionnons le titre, les divers animaux producteurs ont subi pendant de nombreux mois les deux saignées mensuelles habituelles et des inoculations routinières pour maintenir leur immunité. Avant de recevoir des injections d'anatoxine *œdématisiens*, les mulets 937 et 963 avaient été immunisés contre les antigènes *septicum* et saignés mensuellement pendant un an. Quant au sérum 678, signalé dans le tableau I, il a été récolté après avoir fait pendant trois mois seulement deux saignées mensuelles au cheval 678.

Si l'on compare, dans le tableau I, les titres antitoxiques déterminés en présence de deux doses très différentes de toxine *œdématisiens*, on fait les remarques suivantes.

I. — Dans 6 cas (sérums 632, 679 *b*, 382, 679 *a*, 383 et 699), il faut en moyenne dix fois moins de sérum thérapeutique pour neutraliser 0,5 mg de toxine OE 10 que pour en neutraliser 5 mg ; ce fait est normal. Donc, d'après les résultats du titrage de ces 6 anti-sérums, *une unité internationale correspond pratiquement à 10 unités provisoires*. Voici quelques résultats :

Premier exemple. — Le sérum 632 titre 1 500 U. I. ou 15 000 u. p.

Deuxième exemple. — Le sérum 679 *b* titre 3 500 U. I. ou 35 000 u. p.

Troisième exemple. — Le sérum 382 contient 1 500 à 1 800 U. I. ou 15 000 à 18 000 u. p. ; ces données signifient ceci :

a) Toutes les souris ayant reçu 1/1 500 ml de sérum + 5 mg de toxine survivent aux injections ; toutes celles qui ont reçu 1/1 800 ml

de sérum + 5 mg de toxine meurent. b) Les souris ayant reçu 1/15 000 ml de sérum + 0,5 mg de toxine vivent ; celles qui ont reçu 1/18 000 ml de sérum + 0,5 mg de toxine meurent.

TABEAU I. — Pouvoir antitoxique de onze sérums anti-œdématisants fraîchement prélevés, non chauffés. Titres exprimés en unités internationales anti-œdématisants (U.I.) et en unités provisoires (u. p.) par ml de sérum (titrages sur souris, injections sous-cutanées.)

Numéro du Sérum	Durée de l'immunisation anti-oedématisants de l'animal donneur	Titre recherché en présence de 5 mg de toxine	Titre recherché en présence de 0,5 mg de toxine
		(U I)	(u p)
632	49 mois	1500	15.000
679b	25 mois	3500	35.000
382	61 mois	1500-1800	15.000-18.000
679a	24 mois	3000-3500	30.000-35.000
699	55 mois	200	2.000
383	9 mois	400	4.000
678	4 mois	5000	70.000
963c	6 mois 1/2	500	6.200
628	49 mois	1500-1800	30.000-40.000
937a	3 mois 1/2	1800-2000	60.000-80.000
963a	3 mois 1/2	700	50.000

Quatrième exemple. — Le sérum 679 a titre 3 000 à 3 500 U. I. ou 30 000 à 35 000 u. p. (toutes les souris qui reçoivent 1/30 000 ml de sérum + 0,5 mg de toxine OE 10 vivent).

Ces observations montrent que pour donner en U. I. le titre des sérums frais 632, 679 a, 679 b, 382, 383 et 699, il suffit de diviser par 10 les résultats indiqués en unités provisoires, c'est-à-dire les résultats des titrages effectués vis-à-vis du dixième de la dose L+ de la toxine œdématisants employée dans l'expérience (0,5 mg de la toxine OE 10).

II. — *Dans deux autres cas*, nos titrages établissent que l'unité internationale correspond à 12 ou 14 unités provisoires ; ainsi, le sérum 963 c titre 500 U. I. ou 6 200 u. p. ; le sérum 678, 5 000 U. I. ou 70 000 u. p. (1/70 000 ml de ce sérum neutralise 0,5 mg de toxine OE 10, soit 131 DMm).

III. *Dans les trois derniers cas*, il faut vingt à soixante-dix fois moins de certains sérums fraîchement prélevés pour neutraliser 0,5 mg de toxine œdematiens que pour en neutraliser 5 mg. Ces résultats aberrants sont les suivants :

Premier exemple. — 5 mg de toxine OE 10 sont totalement neutralisés par 1/1 500 ml de sérum 628 (toutes les souris survivent) et incomplètement neutralisés par 1/1 800 ml de ce sérum (toutes les souris meurent). *Théoriquement*, 1/18 000 ml du même sérum ne devrait pas supprimer toute la nocivité de 0,5 mg de toxine. Or, *expérimentalement*, 1/30 000 ml de sérum annule totalement la nocivité de cette quantité de toxine (toutes les souris survivent à l'injection) ; par contre, 1/40 000 ml de sérum neutralise incomplètement 0,5 mg de toxine (toutes les souris meurent). D'après ces titrages, le sérum mentionné titre 1 500 à 1 800 U. I. ; il semble contenir 30 000 à 40 000 unités provisoires, soit deux fois plus environ que nous l'avons calculé en appliquant la règle des proportions multiples.

Deuxième exemple. — Il faut 1/1 800 ml de sérum 937 a pour neutraliser totalement 5 mg de toxine ; 1/2 000 ml de ce sérum ne détermine pas la neutralisation totale. Il suffit d'employer ce sérum à la dose de 1/60 000 ml pour neutraliser totalement dix fois moins de toxine. Dans le tableau I, nous avons noté que ce sérum titre 1 800 à 2 000 U. I. ou 60 000 à 80 000 unités provisoires. En nous basant sur le résultat exprimé en unités internationales, nous avons supposé que ce sérum contiendrait seulement 18 000 à 20 000 u. p.

Troisième exemple. — La moitié des souris qui reçoivent 1/700 ml de sérum 963 a additionné de 5 mg de toxine OE 10 survivent ; il suffit d'ajouter 1/50 000 ml de ce sérum à 0,5 mg de la même toxine pour protéger la moitié des souris injectées. Le premier résultat indique que le sérum titre 700 U. I. ; le deuxième laisse supposer qu'il contient 50 000 unités provisoires, c'est-à-dire sept fois plus que nous le pensions. Le 963 a manifeste donc un pouvoir combinant relativement considérable à l'égard de la toxine œdematiens employée à faible dose.

En consultant le tableau I, on voit que le sérum 628 provient d'un cheval en immunisation depuis quarante-neuf mois ; les sérums 937 a et 963 a sont respectivement prélevés aux mulets 937 et 963 trois mois et demi après la première injection d'anatoxine œdematiens. Faisons

remarquer qu'en titrant le sérum fraîchement prélevé 963 c, fourni par le mulet 963 six mois et demi après le début de l'immunisation indiquée, nous trouvons des résultats sensiblement normaux, puisque le rapport entre le titre exprimé en unités provisoires et le titre international de ce sérum est égal à 12,4 (au lieu de 10) ; ceci montre que la constitution du sérum de l'animal change fortement en peu de temps (le temps écoulé entre le prélèvement des sérums 963 a et 963 c est seulement de trois mois).

Après avoir observé que les résultats des titrages effectués respectivement vis-à-vis de 5 mg ou de 0,5 mg de toxine OE 10 (c'est-à-dire vis-à-vis de 1 315 DMm ou 131 DMm) indiquent qu'il faut parfois vingt à soixante-dix fois plus de sérum pour neutraliser 5 mg de toxine *œdematiens* que pour en neutraliser 0,5 mg, nous avons chauffé pendant une heure dans un bain-marie à 56° une partie aliquote des 3 sérums fraîchement prélevés 628, 937 a et 963 a dont nous venons de mentionner l'activité avant tout chauffage. Nous avons recherché ultérieurement l'influence du chauffage à 56° sur l'activité antitoxique de plusieurs autres sérums ; dans le tableau II, où sont inscrits les titres des sérums chauffés 937 a et 963 a, nous notons les résultats obtenus avec les sérums 937 b et 963 c ; dans le tableau III, nous donnons les titres des sérums 628, 937 c, 937 d, 963 b, 383, 699 et 679 b.

Les sérums 937 b, 937 c et 937 d sont prélevés au mulet 937 respectivement quatre mois et demi, cinq mois et demi et six mois et demi après la première injection d'anatoxine *œdematiens* ; le sérum 963 b est prélevé au mulet 963 cinq mois et demi après le début de l'immunisation anti-*œdematiens*. Les sérums 383, 699 et 679 b sont des sérums de chevaux (voir dans le tableau I la durée de l'immunisation).

Pour titrer tous les sérums chauffés, nous avons naturellement utilisé comme doses d'épreuve de toxine *œdematiens* 5 mg et 0,5 mg de la préparation OE 10. En même temps, nous avons recommencé le titrage des sérums non chauffés pour bien comparer tous les résultats et nous rendre compte du même coup si l'affinité des sérums récoltés depuis dix à vingt jours restait stable pendant ce laps de temps.

POUVOIR ANTITOXIQUE COMPARÉ DES SÉRUMS ANTI-*œdematiens* TITRÉS AVANT ET APRÈS UNE HEURE DE CHAUFFAGE A 56°.

Nos différents titrages donnent les résultats suivants : le sérum 963 a non chauffé titre encore 700 U. I. lorsque la dose d'épreuve de toxine utilisée est de 5 mg et 50 000 u. p. quand le titrage est fait en présence de 0,5 mg de toxine. Après une heure de chauffage à 56°, le sérum 963 a contient 600 U. I. (troisième colonne du tableau II) ou 6 000 u. p. (quatrième

colonne du même tableau). Ainsi donc, il faut dix fois moins de sérum 963 *a chauffé* pour neutraliser 0,5 mg de toxine que pour en neutraliser 5 mg ; par conséquent, les doses protectrices de ce sérum *chauffé* sont proportionnelles aux doses de toxine employées dans le titrage. Un simple calcul montre que 10 unités provisoires de sérum 963 *a chauffé* correspondent à 1 unité internationale.

TABEAU II. — Pouvoir antitoxique, après une heure de chauffage à 56°, de 5 sérums anti-œdématisiens fraîchement prélevés. Titres exprimés en unités internationales (U. I.) et en unités provisoires (u p) par ml de sérum.

Numéro du Sérum	Durée de l'immunisation anti-œdématisiens de l'animal donneur	Titre recherché en présence de 5 mg de toxine (U I)	Titre recherché en présence de 0,5 mg de toxine (u p)
679b	25 mois	3500	35.000
937a	3 mois 1/2	1800-2000	18.000-20.000
937b	4 mois 1/2	2200	24.000
963a	3 mois 1/2	600	6.000
963c	6 mois 1/2	450-500	4.500-5.000

Les résultats du titrage du sérum 963 *a non chauffé* avaient révélé une anomalie prononcée, puisqu'ils avaient mis en évidence que pour neutraliser 0,5 mg de toxine il fallait soixante-dix fois moins de ce sérum que pour en neutraliser 5 mg. Les résultats du titrage du sérum 963 *a chauffé* prouvent que cette anomalie est supprimée par le chauffage à 56° pendant une heure. Une élévation de température aussi modérée, pendant un temps assez court, suffit donc pour faire disparaître la cause de l'efficacité imprévue des doses minimales d'immunsérum frais mis en contact avec une faible dose de toxine *œdématisiens*. Semblable constatation découle des titrages suivants.

Les nouveaux contrôles confirment que le sérum 937 *a non chauffé* titre encore 1 800 à 2 000 U. I. et 60 000 à 80 000 u. p. Le sérum *chauffé* contient 18 000 à 20 000 u. p. Donc 10 unités provisoires de ce sérum *chauffé* correspondent à 1 unité internationale comme dans le cas précédent.

Le sérum 628 non chauffé titre toujours 1 500 à 1 800 U. I. et se comporte comme s'il contenait encore 30 000 à 40 000 u. p. ; le sérum 628 chauffé contient 15 000 à 18 000 u. p. (tableau III). Une fois de plus, 10 unités provisoires de sérum chauffé correspondent à 1 U. I.

TABLEAU III. — Pouvoir antitoxique de sept sérums anti-œdématisiens fraîchement prélevés. Les sérums sont titrés avant et après une heure de chauffage à 56°; les titres sont exprimés en unités internationales (U.I.) et en unités provisoires (u.p.) par ml de sérum.

Numéro du Sérum	Titre des sérums non chauffés		Titre des sérums chauffés pendant 1 h. à 56° (u p)
	(U I)	(u p)	
628		30.000-40.000	15.000-18.000
937c		30.000	20.000
963b		5.000-6.000	3.500-4.000
937d		18.000	15.000
383	400	4.000	3.500 - 4.000
699	200	2.000	2.000
679 b	3.500	35.000	35.000

Etant donné l'économie de toxine œdématisiens que l'on fait lorsqu'on titre les sérums en présence du dixième de la dose L + d'une telle toxine, il est intéressant de savoir qu'il est permis d'utiliser cette dose d'épreuve de toxine au cours du titrage des sérums œdématisiens chauffés pendant une heure à 56° ; en divisant par 10 les résultats des dosages réalisés dans ces conditions, on obtient des nombres qui indiquent correctement en unités internationales anti-œdématisiens le titre antitoxique des sérums examinés.

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, nous avons non seulement chauffé et titré les 3 sérums que nous venons de mentionner, mais plusieurs autres encore. Parmi ceux-ci, citons-en 4 : les sérums 699 et 679 b ne s'atténuent pas pendant

le chauffage ; le sérum 383 perd 6 à 8 p. 100 de son activité antitoxique et le sérum 937 *d*, 16 p. 100 (tableau III).

L'ensemble de nos résultats met en parallèle les notions suivantes :

a) Certains sérums anti-œdématisiens fraîchement prélevés, non chauffés (sérums 963 *a*, 937 *a*, 628), ont une constitution telle que leur pouvoir combinant à la toxine œdématisiens employée à faible dose (0,5 mg) est deux à sept fois plus élevé que celui des sérums correspondants chauffés pendant une heure à 56°.

b) Ce chauffage, par contre, ne modifie pas ou que très peu l'aptitude des mêmes sérums à supprimer la nocivité de la toxine œdématisiens employée à dose élevée (5 mg) ; rapprochons, en effet, les résultats que nous avons obtenus lorsque nous avons recherché vis-à-vis de 5 mg de toxine le titre antitoxique des sérums avant et après les avoir maintenus une heure à 56° (de tels résultats indiquent en U. I. le titre des sérums examinés). On voit, par exemple, que le sérum 937 *a* titre 1 800 à 2 000 U. I. avant et après le chauffage. Le sérum 963 *a* non chauffé titre 700 U. I. et le sérum chauffé, 600 ; la diminution d'activité antitoxique que provoque le chauffage est appréciable dans ce cas, mais relativement légère.

c) Lorsqu'on porte pendant une heure à 56° des sérums anti-œdématisiens qui manifestent une avidité normale envers la toxine œdématisiens, on constate que le chauffage indiqué ne diminue pas, ou abaisse seulement de 6 à 16 p. 100 leur pouvoir combinant à la toxine œdématisiens utilisée à faible ou forte dose. Remarquons, en effet, les résultats observés en titrant les sérums 679 *b* et 937 *d* (tableau III). Le sérum 679 *b* titre 35 000 u. p. et 3 500 U. I. après une heure de chauffage à 56°, comme avant cette élévation de température. Le sérum 937 *d* titre 18 000 u. p. avant le chauffage et 15 000 après.

Après avoir observé l'influence du chauffage à 56° sur l'activité antitoxique des sérums anti-œdématisiens 963 *a*, 937 *a* et 628 titrés en présence d'une faible dose de toxine œdématisiens (0,5 mg) peu de temps après la saignée des animaux donneurs, nous avons envisagé de recommencer plusieurs mois plus tard le titrage des mêmes sérums.

Nos recherches antérieures [2] sur la diminution d'avidité que peut subir un sérum anti-histolyticum pendant le vieillissement (2), nous engageaient, en effet, à rechercher si un tel chan-

(2) En 1947-1948, nous avons signalé les faits suivants : 1° Lorsqu'on mélange dans des proportions précises des sérums anti-*perfringens*, anti-*septicum*, anti-œdématisiens et anti-histolyticum de titres antitoxiques connus, on obtient des solutions dont le titre anti-histolytique déterminé expérimentalement dépasse parfois de 50 à 85 p. 100 le titre

gement était susceptible de se produire en quelques mois dans les trois sérums anti-œdématisiens précédemment cités.

POUVOIR ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-œdématisiens
APRÈS PLUSIEURS MOIS DE CONSERVATION A LA TEMPÉRATURE AMBIANTE.

L'essai est fait avec 3 sérums ayant manifesté, aussitôt après le prélèvement, une avidité inattendue pour la toxine œdématisiens employée à faible dose. Une portion des sérums 963 a, 937 a et 628 n'est pas chauffée à 56°; une autre est portée à 56° pendant une heure; le tout est conservé pendant cinq mois à une température de 22-24°, puis titré en présence de 0,5 et 5 mg de toxine OE 10.

RÉSULTATS DES TITRAGES EN PRÉSENCE DE 0,5 mg DE TOXINE. — 1° Pendant la conservation, les sérums chauffés perdent environ 10 p. 100 de leur pouvoir neutralisant.

2° Les sérums non chauffés, mais âgés de 5 mois, ont un titre égal ou légèrement inférieur à celui des sérums correspondants chauffés à 56°, puis conservés pendant cinq mois. Pendant le vieillissement indiqué, les sérums non chauffés sont donc devenus comparables à des sérums chauffés à 56°.

RÉSULTATS COMPARÉS DES TITRAGES EFFECTUÉS EN PRÉSENCE DE 0,5 ET DE 5 mg DE TOXINE. — Pour neutraliser 0,5 mg de toxine OE 10, il faut dix fois moins de sérum âgé de 5 mois que pour neutraliser 5 mg de cette toxine,

RÉSUMÉ.

Le titre antitoxique de divers sérums anti-œdématisiens de type A, fraîchement prélevés, est déterminé en présence de toxine œdématisiens homologue préparée en bouillon Vf, puis précipitée par le sulfate neutre d'ammonium et desséchée. Deux doses d'épreuve de toxine œdématisiens sont utilisées au cours des recherches : la dose L+ de cette toxine et le dixième de la dose L+.

Le rapport entre le volume de sérum qui neutralise la dose L+ de la toxine employée dans le titrage (5 mg) et le volume de sérum qui neutralise le dixième de la dose L+ (0,5 mg) est souvent égal ou légèrement supérieur à 10.

prévu par le calcul. 2° Si le sérum anti-histolytique ajouté aux autres sérums antigangréneux est employé après une longue conservation à la température ambiante ou après délipidation, le titre anti-histolytique expérimental du mélange ainsi préparé concorde pratiquement avec le titre théorique.

Parfois, ce rapport est égal à 20, à 30 ou à 70 ; ces valeurs élevées révèlent que certains sérums anti-œdématisiens fraîchement prélevés, non chauffés, titrés en présence d'une faible dose de toxine œdématisiens (0,5 mg) manifestent une activité antitoxique deux à sept fois plus grande que celle qu'ils auraient dû théoriquement exercer. De tels sérums perdent leur *surcroît relatif d'affinité* pour une faible dose de toxine œdématisiens lorsqu'ils sont chauffés à 56° pendant une heure ou conservés à la température ambiante pendant quelques mois ; cependant, leur aptitude à neutraliser une quantité dix fois plus grande de toxine ne change pas ou ne diminue que faiblement au cours du chauffage et du vieillissement indiqués. Si on fait agir ces immun-sérums chauffés, ou âgés de plusieurs mois, sur des poids de toxine œdématisiens variant de 1 à 10 (sur 0,5 et 5 mg par exemple), on constate alors que les doses protectrices de chaque sérum sont proportionnelles aux quantités de toxine employées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GUILLAUMIE. *Ces Annales*, 1942, **68**, 202.
- [2] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 141. — M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et G. BÉCOULET, *C. R. Soc. biol.*, 1948, **142**, 125.

INFLUENCE DU COBALT SUR LA MULTIPLICATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET SUR L'ACTIVITÉ ANTISTAPHYLOCOCCIQUE DE LA PÉNICILLINE

par MICHEL FAGUET (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage.)

Le cobalt occupe une place importante en biologie, parmi les oligoéléments dont l'ensemble ne constitue que 0,1 p. 100 de la substance des organismes vivants. G. Bertrand [1] et son école ont montré l'activité biologique du cobalt et jeté les fondements de sa biochimie.

Dans la classification de Mendeleeff, le cobalt occupe la place 27 entre le fer (26) et le nickel (28), bien que son poids atomique soit supérieur à celui du nickel, anomalie restée longtemps sans explication.

De nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle du cobalt dans certaines réactions enzymatiques et l'on sait qu'il est l'un des constituants de la molécule de la vitamine B₁₂. Pratt et Dufrenoy [2] ont montré que l'addition de très faibles doses de chlorure de cobalt (de l'ordre du microgramme par centimètre cube de milieu) à la pénicilline renforçait considérablement son action *in vitro* et même *in vivo* : 256 microgrammes de chlorure de cobalt ajoutés à 2 000 unités de pénicilline et appliqués à la souris infectée par *Eberthella typhosa* équivalaient à l'activité de 4 000 unités de pénicilline [3].

Nous avons pensé qu'il était intéressant d'étudier l'action du cobalt sur *Staphylococcus aureus*, en utilisant la méthode des enregistrements continus de la multiplication microbienne par le microbiophotomètre enregistreur MECI. Cette technique permet, en effet, de déceler des influences même minimes, sur la croissance bactérienne [4].

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

Pour ce travail, nous avons utilisé le microbiophotomètre enregistreur MECI, qui permet l'enregistrement continu de six courbes

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 novembre 1953.

de croissance simultanées, correspondant à six cultures différentes.

Ces cultures étaient placées dans des cuves circulaires de 22 mm de diamètre, convenablement agitées. La température était réglée automatiquement à 37° C.

Le milieu de culture était constitué par une eau peptonée (peptone UCLAF) à 3 p. 100 et glucosée à 0,3 p. 100.

Les germes utilisés étaient des souches de *Staphylococcus aureus* (CH₁ et OX₁). Les ensemencements étaient faits à partir

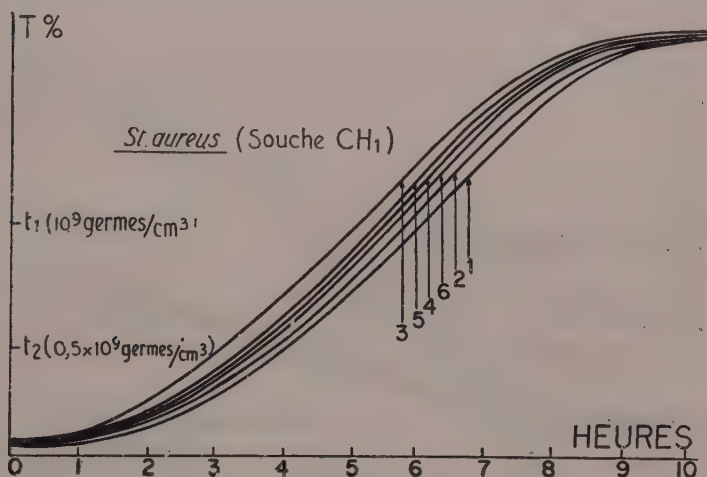


FIG. 1. — Courbes de croissance, enregistrées au microbiophotomètre, de *St. aureus* (souche CH₁). En abscisses, les heures; en ordonnées, la transmission optique de la culture ou son équivalent en nombre de germes par centimètre cube. 4. Courbe de croissance témoin de *St. aureus* (souche CH₁) en milieu ordinaire. Les courbes 3, 5, 6, 2, 1 représentent la culture de *St. aureus* (souche CH₁) dans le même milieu additionné respectivement de 100, 75, 50, 150 et 250 microgrammes de chlorure de cobalt pour 20 cm³ de milieu.

d'une culture en eau peptonée glucosée prise à la sixième heure de sa croissance à 37°. Le nombre de germes à l'origine était voisin de 10⁶ par centimètre cube.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'action du chlorure de cobalt seul sur la multiplication de *Staphylococcus aureus* aux doses de 75, 100, 150, 250 et 375 microgrammes pour 20 cm³ de milieu de culture. Les courbes de la figure 1 résument cette étude. Elles montrent qu'à ces doses, le chlorure de cobalt favorise la croissance de *St. aureus* (souche CH₁). La dose de 100 microgrammes pour 20 cm³ est la dose optimum.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons étudié

l'action de la pénicilline aux doses sub-bactériostatiques et son action renforcée par l'addition de chlorure de cobalt. Pour *St. aureus* OX₁, la dose de 0,03 unité de pénicilline par centimètre cube empêche totalement la croissance. Nous avons utilisé la dose de 0,02 unité par centimètre cube et celle, dix fois moins forte, de 0,002 unité par centimètre cube, additionnée de 25 microgrammes de chlorure de cobalt pour 20 cm³ de milieu, nous rapprochant ainsi des conditions expérimentales indiquées par Pratt et DuRenoy. Les courbes correspondant à cette expérience

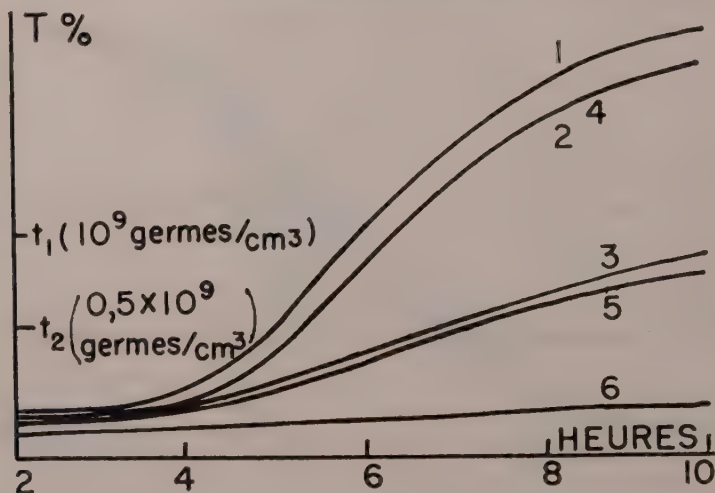


FIG. 2. — Courbes de croissance enregistrées au microbiop¹ otomètre de *St. aureus* (souche OX₁) dans un milieu constitué par une eau peptonée à 3 %, glucosé à 0,3 %. 1. Courbe de croissance témoin de *St. aureus* (souche OX₁). 2 et 4. Courbes de croissance de *St. aureus* (OX₁) dans le même milieu, additionné de 0,002 unité de pénicilline par centimètre cube et de 25 microgrammes de chlorure de cobalt pour 20 cm³ de milieu. 3 et 5. Courbes de croissance de *St. aureus* (OX₁) dans le même milieu, additionné de 0,02 unité de pénicilline par centimètre cube.

(fig. 2) montrent que l'association cobalt (25 microgrammes)-pénicilline (0,002 unité par centimètre cube) [courbes 2 et 4] n'a pas une action aussi énergique que 0,02 unité de pénicilline par centimètre cube (courbes 3 et 5).

Dans une troisième série d'expériences, nous avons augmenté la dose de cobalt et nous l'avons portée à 50 microgrammes pour 20 cm³ de milieu (courbe V) et à 75 microgrammes (courbe VI). Les courbes II, III, IV représentent la croissance de *St. aureus* (souche CH₁) en présence de quantités croissantes de pénicilline : 0,015 unité par centimètre cube, 0,017 unité par centimètre cube

et 0,02 unité par centimètre cube. L'étude des courbes montre : 1° que le maximum de la croissance pour les cultures ayant reçu du cobalt et de la pénicilline est atteint plus rapidement qu'avec les cultures n'ayant reçu que la pénicilline ; 2° que l'addition de 50 microgrammes de chlorure de cobalt à 0,015 unité de pénicilline (courbe V) ramène le maximum de croissance à d_1 , qui est approximativement à égale distance de d et de d_3 ; cela correspond à une diminution de l'ordre de 20 p. 100 du nombre des germes de la culture représentée par la courbe II.

Dans les séries précédentes d'expériences, toutes les cultures

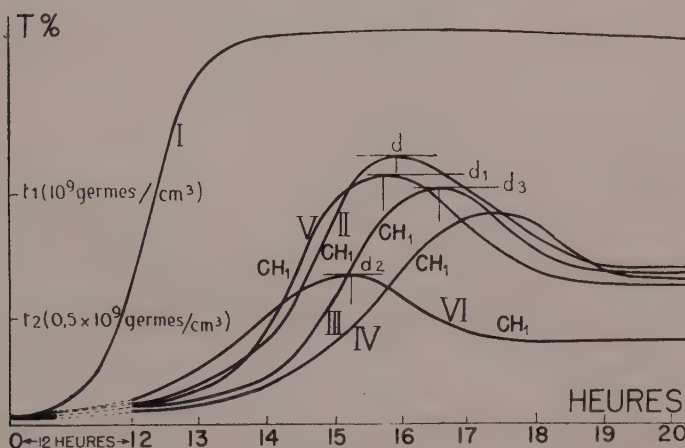


FIG. 3. — Courbes de croissance, enregistrées au microbiophotomètre MECL, de *St. aureus* (souche CH₁). I, courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁), en milieu ordinaire; II, III, IV, courbes de croissance de *St. aureus* (souche CH₁); le milieu a été additionné respectivement de 0,015, 0,010 et 0,02 unité de pénicilline par centimètre cube; V, courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁ en milieu ordinaire, additionné de 0,015 unité par centimètre cube de pénicilline et de 50 microgrammes de chlorure de cobalt; VI, courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁) en milieu ordinaire, additionné de 0,015 unité de pénicilline par centimètre cube et de 75 microgrammes de chlorure de cobalt.

étaient obtenues par ensemencement avec 10⁶ germes par centimètre cube d'une culture en eau peptonée glucosée, âgée de 6 heures, à l'étuve et à 37° C.

Dans la quatrième série d'expériences, nous avons utilisé des cultures âgées d'une semaine pour effectuer les ensemencements (fig. 4).

Nos essais nous ont permis de constater que l'association du chlorure de cobalt à des doses de pénicilline sensiblement égales à celles des expériences précédentes augmentait l'activité de la

pénicilline ; c'est ainsi qu'à son maximum, la culture additionnée de cobalt et de pénicilline contenait une quantité de germes inférieure d'environ 30 p. 100 à celle de la culture contenant la pénicilline seule.

DISCUSSION.

Nos expériences montrent, d'une part, qu'aux doses comprises entre 2 et 5 microgrammes par centimètre cube, le chlorure de cobalt possède une action favorisante sur la croissance de

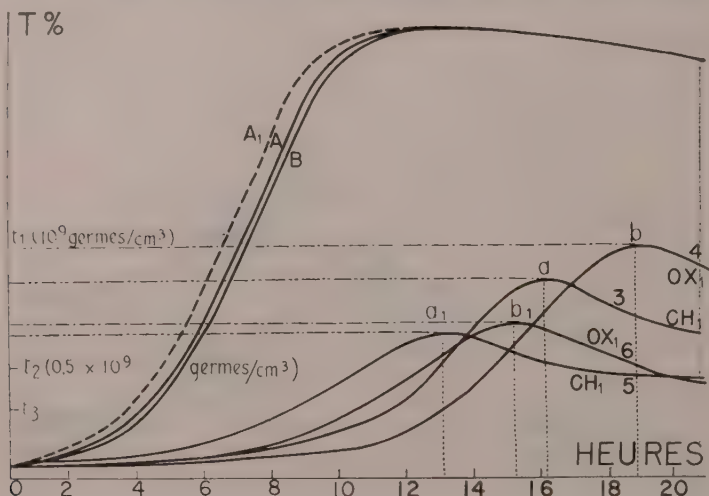


FIG. 4. — Courbes de croissance, enregistrées au microbiophotomètre, de : A, *St. aureus* (souche CH₁), B, *St. aureus* (souche OX₁). A₁, courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁) cultivé en milieu ordinaire, additionné de 100 microgrammes de chlorure de cobalt pour 20 cm³ de milieu. 3. Courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁). Le milieu a été additionné de 0,02 unité de pénicilline par centimètre cube. 5. Courbe de croissance de *St. aureus* (souche CH₁). Le milieu a été additionné de 0,02 unité de pénicilline et de 100 microgrammes de chlorure de cobalt. 4. Courbe de croissance de *St. aureus* (souche OX₁). Milieu additionné de 0,02 unité de pénicilline. 6. Courbe de croissance de *St. aureus* (souche OX₁). Milieu additionné de 0,02 unité de pénicilline et de 100 microgrammes de chlorure de cobalt.

St. aureus, et que, d'autre part, ces mêmes doses qui ne sont donc nullement inhibitrices renforcent cependant l'activité bactériostatique de la pénicilline.

Knight [5] croit que cette augmentation de l'activité antibiotique de la pénicilline par le chlorure de cobalt provient, soit de la formation d'un complexe entre le cobalt et les groupes — SH de la cellule, soit en amenant le potentiel d'oxydo-réduction plus près de l'optimum pour l'activité de la pénicilline.

Gros et Machebœuf [6] ont montré que la pénicilline cause des perturbations dans le métabolisme ribonucléique des bactéries. Krampitz et Werkman [7], utilisant *S. aureus*, ont observé une action inhibitrice de la pénicilline sur certains processus oxydatifs liés à l'utilisation du ribose au cours du catabolisme de l'acide ribonucléique.

Enfin, Boivin et ses collaborateurs [8] ont vu que la pénicilline empêche la synthèse de l'acide ribonucléique au cours de la croissance bactérienne. Toutefois, la première étape du catabolisme de l'acide ribonucléique ne semble pas directement influencée par l'antibiotique, car Machebœuf a montré, en effet, que l'activité de la ribonucléase n'est pas modifiée par la pénicilline. Récemment, Miura et Nakamura [9], étudiant l'action inhibitrice de substances variées sur la ribonucléase, ont trouvé que le chlorure de cobalt possède une action inhibitrice importante (12 à 13 p. 100), alors que celle du nickel est de 1 p. 100 et celles du fer et du manganèse de 0 p. 100. On peut donc penser que l'augmentation du pouvoir antibiotique de la pénicilline par addition de chlorure de cobalt résulte d'une action sur la première étape du catabolisme de l'acide ribonucléique, étape non touchée par la pénicilline seule.

Enfin, un dernier effet peut s'ajouter au précédent ; l'inhibition de la ribonucléase entraîne une diminution de l'autolyse des cellules bactériennes [10]. Or, les germes en croissance [11] utilisent peut-être les produits de cette lyse microbienne ; c'est pourquoi, si l'on introduit dans la culture un facteur qui diminue ou supprime l'autolyse, on diminue de ce fait la croissance de la culture et il en résultera indirectement un effet de synergie.

CONCLUSIONS.

Nous avons étudié la croissance de deux souches de *Staphylococcus aureus* en présence de quantités de chlorure de cobalt, variant de 1 à 5 microgrammes par centimètre cube de milieu de culture.

L'addition de ces faibles quantités de chlorure de cobalt stimule la croissance de *St. aureus*. Toutefois les mêmes quantités ajoutées au milieu contenant déjà une quantité déterminée de pénicilline accroissent le pouvoir antibiotique de cette dernière.

Le mode d'action du chlorure de cobalt nous paraît relié à son action inhibitrice sur la ribonucléase et peut-être, par surcroît, à la diminution de la lyse bactérienne qui en résulte.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BERTRAND. *Bull. Soc. Chim. France*, 1894, **11**, 717.
- [2] R. PRATT et J. DUFRENOY. *J. Bact.*, 1948, **55**, 727.

- [3] R. PRATT, J. DUFRENOY et L. A. STRAIT. *J. Bact.*, 1948, **55**, 75.
- [4] M. FAGUET. *La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne*. Préface de J. Tréfouël, Hermann édit., 1941, n° 898 et *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **126**, 967.
- [5] S. G. KNIGHT. *Bacterial Physiol.*, 1951, p. 516.
- [6] F. GROS, F. BELJANSKI et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1696.
- [7] L. O. KRAMPITZ et C. H. WERKMAN. *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 57.
- [8] A. BOIVIN, R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK. *Bull. Acad. Méd.*, 1948, **132**, 37.
- [9] Y. MIURA et Y. NAKAMURA. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **83**, n° 10.
- [10] A. S. JONES, M. STACEY et M. WEBB. *Bioch. et Bioph. Acta*, 1949, **3**, 383.
- [11] P. BONÉT-MAURY et R. PÉRAULT. *Nature*, 1945, **155**, 701.

LA CONTAMINATION DES POISSONS ET LE PROBLÈME DES EAUX POLLUÉES

par A. GUELIN.

(Laboratoire de Biologie Marine de Plymouth
et Institut Pasteur, Paris.)

Dans une de nos publications précédentes, nous avons rapporté que l'intestin des poissons, pêchés au large de la Méditerranée, est exempt d'Entérobactéries, tandis que les poissons, pêchés dans la zone littorale, présentent souvent une flore intestinale analogue à celle de l'homme ou des animaux à sang chaud.

Etant donné que les eaux prélevées loin des côtes sont, en général, dépourvues de bactéries et de bactériophages intestinaux (qu'on rencontre en grande abondance dans la zone littorale), nous nous sommes demandé si l'état bactériologique des viscères des poissons reflétait l'état sanitaire des eaux où ces poissons se déplacent. La question ainsi posée soulève un certain nombre de problèmes d'ordre écologique et physiologique.

Jusqu'à présent, les recherches bactériologiques sur les poissons ont eu pour objet principal la détection de la présence d'*E. coli*. La plupart des auteurs considèrent la contamination par ce germe comme purement accidentelle, mais ils ne donnent aucune précision sur sa durée. Markoff affirme que tôt ou tard les poissons se débarrassent de l'infection contractée. D'après ZoBell, les Entérobactéries ne font pas partie de la flore habituelle des poissons, mais, une fois installées, elles peuvent s'y maintenir longtemps.

L'hypothèse, émise par R. Buttiaux au cours de nos précédentes recherches, sur l'impossibilité pour les Entérobactéries de survivre dans le tube digestif des poissons, nous a conduite à l'étude de la contamination expérimentale de ces derniers.

Toutes les expériences ont été faites au Laboratoire de Biologie Marine de Plymouth. Le matériel recueilli a été étudié à l'Institut Pasteur, au Service du Bactériophage.

Au cours de ces expériences, 61 exemplaires de *Ctenolabrus rupestris*, de taille moyenne, ont été contaminés soit par *E. coli*-16 (33 exemplaires), soit par le *coli*-phage 36 (28 exemplaires). La

(*) Manuscrit reçu le 20 octobre 1953.

souche d'*E. coli*-16 nous a été obligeamment donnée par le Dr P. Nicolle, à qui nous adressons nos sincères remerciements.

L'étude physiologique, biochimique et sérologique d'*E. coli*-16, faite par le Dr Le Minor, a donné les résultats suivants :

Antigène O	O 16
Antigène K	L ₁
Antigène H	Absence de l'antigène H.

Mobilité	0
Xylose	+ ¹
Arabinose	+ ¹
Glucose	+ ¹ gaz.
Mannitol	+ ¹
Dulcitol	+ ¹
Lactose	+ ¹
Maltose	+ ¹
Saccharose	0
Salicine	+ ²
Inositol	0
Sorbitol	0
Rouge neutre	+ ²
Citrate	0
Uréase	0
Indole	+
H ₂ S	0
Red-methyl test	+
Voges-Proskauer	0

Hémolyse des globules rouges de cheval : légère.

Sensibilité aux antibiotiques (technique sur boîtes de gélose.)

Pénicilline	Résistant à plus de	4 U.I.
Streptomycine	—	4 mcg/ml
Auréomycine	—	4 mcg/ml
Terramycine	—	2 mcg/ml
Chloromycétine	—	14 mcg/ml

La contamination des 33 poissons par *E. coli* est effectuée dans un bocal contenant de l'eau de mer, aérée par passage d'air comprimé. Les bactéries d'une culture de dix-huit heures, prélevée à la surface de la gélose peptonée, sont introduites dans l'eau du bocal. Le titre de la suspension est de 3.10^8 bactéries par centimètre cube d'eau. Les poissons, après avoir séjourné pendant soixante minutes dans cette eau, sont transportés dans un aquarium contenant de l'eau non infectée.

La contamination des 28 poissons par le bactériophage s'effectue, pendant soixante minutes, dans d'autres bocaux contenant 2.10^8 corpuscules phages par centimètre cube d'eau.

Le bactériophage *coli*-36, utilisé pour la contamination du deuxième lot de poissons, n'est pas actif vis-à-vis de la souche *E. coli*-16. Le filtrat bactériophagique est préparé en eau peptonée glucosée, en présence d'*E. coli*-36 (souche de Burnet).

Les deux lots de poissons sont nourris avec des vers, *Arenicola marina*, ramassés à marée basse, dans le sable, le long de la côte.

Quotidiennement, quelques poissons de chaque lot sont placés dans de petits récipients vides. Aussitôt que les poissons sont morts, leurs viscères sont prélevés stérilement, placés dans des verres de montre, broyés et additionnés de 10 ml d'eau peptonée. On procède ensuite à la recherche soit des bactéries, soit des bactériophages.

Pour la recherche d'*E. coli*, on prépare des dilutions du broyat en eau peptonée ; 0,05 ml de chaque dilution est étalé sur des plaques de milieu de Kristensen. Le reste de la suspension est éprouvé de nouveau, après son enrichissement à 37° pendant vingt-quatre heures. *E. coli*-16 cultive bien sur la gélose de Kristensen, formant des colonies jaune clair.

Dans les cas où les viscères infectés contenaient un germe virant au jaune le milieu de Kristensen, l'étude des caractères culturaux, biochimiques et sérologiques des colonies isolées a été accompagnée par la recherche de la sensibilité de ce germe au *coli*-16. Ces différentes épreuves, en particulier l'épreuve sérologique, nous ont donné la certitude que les souches d'*E. coli*, isolées des viscères, provenaient effectivement de la souche *E. coli*-16 avec laquelle les poissons avaient été infectés auparavant.

Pour la recherche du bactériophage C36 dans les viscères des poissons, le broyat est titré sur une plaque de gélose peptonée,ensemencée avec une suspension dense d'*E. coli*-36. Le reste du broyat est de nouveau éprouvé, après son enrichissement à 37° pendant six heures.

Pour éliminer, chez les poissons, l'éventualité de la présence d'*E. coli* ou du *coli*-phage avant les expériences, nous avons examiné 19 spécimens de *Ctenolabrus rupestris*, prélevés dans le lot destiné à être contaminé. Dans presque tous les cas, les plaques de gélose de Kristensen sont restées stériles, quarante-huit heures après leur ensemencement avec les suspensions de viscères broyés. Nous n'avons jamais décelé l'existence d'*E. coli*, ni de *coli*-phage chez les poissons, avant l'expérience.

Les échantillons d'eau prélevés dans les aquariums, ainsi qu'en différents endroits du port de Plymouth, ont été examinés pour y rechercher la présence de bactériophages intestinaux. Les enrichissements de phages ont été faits sur *Salmonella typhi* Vi. *Salmonella paratyphi* B, *E. coli*-36 et *E. coli*-16. Les résultats ont été les suivants :

Le bactériophage *coli*-36 a été constamment isolé à 3 km de la côte. Nos observations précédentes sur la présence du *coli*-phage 36 au large de l'Océan (Roscoff) et de la Méditerranée

	BACTÉRIOPHAGES (DANS 20 ML D'EAU)			
	<i>S. typhi</i> Vi	<i>S. paraty.</i> B	<i>Coli</i> 33	<i>Coli</i> 16
1° Port de Plymouth. Grand collecteur (à 150 m vers la côte).	—	—	+	—
2° Port de Plymouth. Grand collecteur (à la sortie).	—	—	+	+
3° Port de Plymouth. Grand collecteur (à 150 m vers le large).	—	+	+	+
4° Port de Plymouth. Petit collecteur (situé à côté du laboratoire).	—	—	+	+
5° Port de Plymouth. Lieu de capture des <i>Ctenolabrus rupestris</i> .	—	—	+	—
6° Port de Plymouth. 3 km des côtes vers la haute mer . . .	—	—	+	—
7° Aquariums (avant l'expérience).	—	—	—	—

(Villefranche, Nice, Banyuls) ont toujours été négatives. On est en droit de se demander si, dans le port de Plymouth, les eaux, contaminées par le stationnement de nombreux bateaux et la sortie des collecteurs d'une grande ville, n'accumulent pas le coli-phage loin de la côte.

Les résultats indiqués montrent, également, que l'eau prélevée dans le port de Plymouth (même à la sortie du grand collecteur) ne contient pas de bactériophage typhique. Le phage paratyphique B a été isolé seulement à la sortie de l'égout principal. Rappelons que le bactériophage de *Salmonella* se trouve en permanence dans les eaux de la Seine, de la Tamise et de la Méditerranée (Nice et Villefranche), à proximité de la sortie des égouts.

Les résultats de nos recherches sur les *Ctenolabrus rupestris* contaminés soit par coli-phage (28 exemplaires), soit par *E. coli* (33 exemplaires) ont montré que cette contamination n'a pas été de longue durée. Les bactéries ont disparu des tubes digestifs des poissons en sept jours. Le bactériophage était encore présent le huitième jour.

	POURCENTAGE des poissons contaminés par <i>E. coli</i>	POURCENTAGE des poissons contaminés par le bactériophage
Après 1 à 4 jours	100	100
Après 6 jours	60	80
Après 7 jours	0	10
Après 8 à 12 jours	0	0

Cinq heures après la contamination, nous avons isolé, à partir des viscères des poissons infectés (sans enrichissement préalable),

coli-phage et *E. coli* (ce dernier à l'état pur). Après vingt-quatre heures, la recherche d'*E. coli* et du bactériophage nécessitait déjà un enrichissement du broyat intestinal. Au bout de deux jours, le *coli*-phage et *E. coli* ont été isolés chez tous les poissons sacrifiés, mais *E. coli* était associé à quelques éléments de *Pseudomonas fluorescens* qui, à partir de ce moment, sont devenus de plus en plus nombreux. Le sixième jour, le *coli*-phage a été décelé dans 80 p. 100 et *E. coli* dans 60 p. 100 des cas. Le septième jour, aucun poisson sacrifié ne contenait plus d'*E. coli*. Le bactériophage a disparu vers le huitième jour, bien que l'eau de l'aquarium en ait contenu de faibles quantités, décelables après enrichissement. Rappelons à ce sujet, que le phage *coli*-36 a été trouvé dans les lieux de capture des poissons, dont les tubes digestifs ne présentaient aucune trace de ce bactériophage.

Les résultats obtenus avec la contamination expérimentale des poissons peuvent contribuer à la confirmation de l'hypothèse de Buttiaux, suivant laquelle les bactéries intestinales de l'homme et des animaux à sang chaud ne s'adaptent pas au tube digestif des poissons.

Ces recherches montrent aussi l'intérêt que présenterait l'examen bactériologique des viscères de poissons, pour la détermination de l'état sanitaire des eaux où ces poissons se déplacent. Cet examen pourrait servir de test pour indiquer l'éventualité de la contamination des eaux, étant donné la rapidité avec laquelle les poissons se débarrassent des germes ingérés.

Les résultats exposés sont valables pour les conditions données. Il serait intéressant de refaire les expériences avec des poissons et des bactéries d'autres espèces.

C'est grâce à l'amabilité et aux conseils du Dr F. S. Russell, directeur du Laboratoire de Biologie Marine de Plymouth, que ce travail a été effectué. Nous lui en sommes très reconnaissante.

Nous remercions vivement le Dr R. Buttiaux pour ses indications précieuses concernant la mise au point des expériences et l'identification des souches de *Pseudomonas*.

Nous exprimons notre reconnaissance au Dr L. Le Minor pour l'étude de la souche avec laquelle la contamination des poissons a été réalisée, ainsi que pour le sérum agglutinant qu'il nous a obligeamment fourni.

RÉSUMÉ.

Soixante et un exemplaires de *Ctenolabrus rupestris* ont été contaminés par un *E. coli* et un *coli*-phage.

Dans les conditions de nos expériences, les poissons se sont complètement débarrassés de cette contamination au bout d'une semaine.

Ces résultats nous conduisent à conclure que la recherche des Entérobactéries et Entérophages chez les poissons pourrait renseigner sur l'éventualité d'une pollution des eaux dans lesquelles ces poissons séjournent.

BIBLIOGRAPHIE

- W. BROWNE. *J. Bact.*, 1917, **2**, 417.
J. EYRE, M. DURCH et F. EDIN. *Lancet*, 1904, **1**, 648.
P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 986.
W. FROMME. *Zeitschr. Hyg.*, 1910, **65**, 275.
F. GRIFFITH et F. FULLER. *Amer. J. publ. Health*, 1936, **26**, 259.
A. GUELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 46.
A. HUNTER. *J. Bact.*, 1922, **7**, 85.
G. JOHNSON. *J. infect. Dis.*, 1904, **1**, 348.
R. LEIGUARDA, A. PALAZZOLO et O. PEZO. *Rev. Obras Sanit. Nacion*, 1950, n° 136, 2.
W. MARKOFF. *Zentralbl. Bakt.*, 1939-1940, **II**, **401**, 151.
M. STUTZER. *Zentralbl. Bakt.*, 1926, **66**, 344.
C. ZOBELL. *J. Bact.*, 1941, **42**, 284 ; *Marine Microbiol. U. S. A.*, 1946.

**ÉTUDE COMPARÉE DU TYPE SÉROLOGIQUE,
DE LA SENSIBILITÉ AUX BACTÉRIOPHAGES
ET DE L'ANTIBIOGRAMME
DE 201 SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES
ISOLÉS PAR PRÉLÈVEMENTS SYSTÉMATIQUES
CHEZ LE NOURRISSON**

par J. PILLET, J. CALMELS, B. ORTA et G. CHABANIER (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Le problème de l'infection staphylococcique prend actuellement une orientation nouvelle en raison de deux ordres de faits qui en modifient les données. Ce sont, d'une part, la mise en évidence de l'existence presque constante de staphylocoques au niveau des voies respiratoires et digestives du sujet sain [1, 2, 3, 4, 5], et, d'autre part, les progrès des méthodes d'individualisation de ces germes, qu'il s'agisse de techniques directes telles que l'agglutination spécifique [6, 7, 8] et la lysotypie [9, 10], ou indirecte telle que l'étude de la sensibilité aux divers antibiotiques. L'étude actuelle, tenant compte de ces faits, a pour objet l'identification et le dénombrement des staphylocoques végétant au niveau des cavités naturelles d'une catégorie déterminée de sujets, l'étude des rapports pouvant exister entre ces staphylocoques et ceux provoquant des lésions chez certains de ces sujets, et la recherche de variations possibles de la flore staphylococcique à la suite du séjour à l'hôpital et de traitements par les antibiotiques. Ce travail nous a permis par ailleurs de comparer dans de bonnes conditions les techniques d'individualisation choisies, d'en préciser la valeur et de définir les relations pouvant exister entre les différentes méthodes utilisées.

Les sujets étudiés étant des nourrissons hospitalisés, on peut tirer de ce travail certaines conclusions d'ordre médical qui seront détaillées dans une autre publication [11].

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 novembre 1953.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° PRÉLÈVEMENTS. — Les prélèvements ont été effectués au niveau des fosses nasales, du pharynx et de l'anus, chez 31 nourrissons hospitalisés. Un examen de selles a été effectué systématiquement. Ces prélèvements ont été faits vingt-quatre à quarante-huit heures après l'entrée à l'hôpital afin d'éviter au maximum les chances de contaminations hospitalières.

Dans quelques cas une seconde série de prélèvements a été effectuée après séjour à l'hôpital et traitement par les antibiotiques.

2° TESTS DE PATHOGÉNIE. — Chacune des colonies présentant un aspect différent sur milieu de Chapman a été repiquée et les épreuves suivantes ont été pratiquées sur chacune des souches ainsi obtenues : fermentation du mannitol, élaboration de coagulase, production des toxines α et β .

3° TESTS D'INDIVIDUALISATION. — A. *Sérologie*. — Chacune des souches a été testée par agglutination sur lames vis-à-vis des 9 sérums absorbés préparés à partir des souches I, II, III de Cowan [42] et 4, 5, 6, 7, 8, 9 de Christie et Keogh [43]. L'individualité antigénique de ces souches a été vérifiée précédemment [6, 7, 8].

B. *Lysotypie*. — Nous avons utilisé la technique de Wahl et Fouace [40], dérivée de celle de Wilson et Atkinson [9]. Chacune des souches a été soumise à l'action de 24 phages spécifiques convenablement dilués. La très grande majorité des souches a été testée en utilisant deux lysats de concentrations différentes : le lysat non dilué et le lysat amené à sa dilution critique.

C. *Antibiogramme*. — L'étude de la sensibilité aux antibiotiques peut être considérée comme un test d'individualisation en raison du nombre d'antibiotiques étudiés et de la variété des types de résistance rencontrés. Nous avons utilisé la méthode des disques imprégnés d'antibiotique (disques préparés par l'Institut Pasteur ; antibiotiques utilisés : pénicilline, auréomycine, terramycine, streptomycine, chloromycétine).

En tenant compte des différents facteurs intervenant dans ce type de titrage et du caractère relatif de notre choix, nous avons adopté comme diamètre d'inhibition séparant la sensibilité de la résistance, 20 mm pour la pénicilline, l'auréomycine, la terramycine et la chloromycétine et 15 mm pour la streptomycine.

Ces diamètres correspondent, d'après les courbes étalons, aux concentrations suivantes en μg par centimètre cube : 13 pour l'auréomycine et la terramycine, 20 pour la pénicilline, 25 pour la streptomycine et 32 pour la chloromycétine.

RÉSULTATS.

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES STAPHYLOCOQUES ISOLÉS. — Chaque colonie présentant un aspect caractéristique sur milieu de Chapman a été isolée et nous avons obtenu ainsi 201 souches, dont 140 ont été classées comme pathogènes et 61 comme non pathogènes. Parmi les premières, 127 donnaient des résultats positifs homogènes aux tests de pathogénie, c'est-à-dire qu'elles fermentaient le mannitol, provoquaient la coagulation du plasma oxalaté et élaboraient au moins une hémolysine (15 d'entre elles isolées sur 6 malades produisaient les deux toxines α et β). Quatre souches qui ne fermentaient pas le mannitol et 9 souches ne produisant pas d'hémolysine, mais dont tous les autres tests étaient positifs, ont été de même classées dans le groupe des staphylocoques pathogènes, en raison principalement de l'importance attachée à l'épreuve de la coagulase.

Les 61 souches considérées comme non pathogènes donnaient des résultats négatifs aux différents tests, à l'exception d'une faible production d'hémolysine de type α notée avec un nombre assez important de souches.

Nous avons déjà rencontré ce fait antérieurement [3] et pensons avec Chapman [14] que ce caractère isolé ne permet pas de considérer les souches étudiées comme pathogènes.

Les souches des deux groupes ainsi définis ont été soumises aux tests d'individualisation envisagés et l'on a enregistré les résultats d'ensemble résumés dans le tableau I :

TABLEAU I.

SOUCHES TESTÉES	SÉROLOGIE		LYSOTYPIC	
	+	0	+	0
Pathogènes 140	124	16	117	23
Non pathogènes 61	10	51	0	61

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une différence très nette entre les deux groupes de souches pathogènes et non pathogènes : en effet, 88,5 p. 100 des souches pathogènes réagissent avec au moins un des sérums utilisés et 83,5 p. 100 sont lysées par un ou plusieurs des 24 phages spécifiques, alors que les pourcentages correspondants sont, pour les souches non pathogènes, de 16,3 et 0 p. 100.

Si l'on examine maintenant la sensibilité de ces deux types de souches aux 5 antibiotiques principaux on constate que l'on

n'aboutit nullement à une séparation aussi nette entre souches pathogènes et non pathogènes. En effet, on rencontre les divers types de résistance dans les deux groupes et l'étude comparée de leur sensibilité aux antibiotiques revient à déterminer dans chacun des groupes la proportion des souches présentant un type de résistance particulier.

Le tableau II, dont la disposition est empruntée à Chabbert, résume les résultats obtenus.

TABLEAU II.

P	TYPES S	DE A	RESISTANCE C	T	SOUCHES PATHOGENES	SOUCHES NON PATHOGENES
-	-	-	-	-	15%	31,1%
+	-	-	-	-	20%	3,2%
+	+	-	-	-	12,1%	4,9%
+	+	+	-	+	23,5%	6,5%
+	+	+	+	+	24,2%	9,8%
+	-	+	-	+	1,4%	9,8%
-	+	-	-	-	1,4%	1,6%
-	+	+	-	+	0,7%	8,1%
-	+	+	+	+	1,4%	6,5%
Divers					-	17,9%

On peut tirer de l'examen des résultats du tableau précédent les conclusions suivantes :

1° En ce qui concerne les souches pathogènes, les résultats obtenus sont analogues à ceux publiés par Chabbert et Terrail [15] et on notera plus particulièrement le grand nombre de souches résistantes à la pénicilline et l'importance numérique des groupes entièrement résistants et sensibles seulement à la chloromycétine.

2° Dans le groupe des souches non pathogènes, on constate une plus grande proportion de souches sensibles à la pénicilline et surtout une très grande diversité des types de résistance.

3° Il ne semble pas y avoir de rapport entre le pouvoir pathogène d'une souche et son comportement vis-à-vis des antibiotiques.

En résumé, les deux premières méthodes d'individualisation utilisées : sérologie et lysotypie, permettent de séparer nettement les staphylocoques pathogènes des non pathogènes, alors que

l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne permet aucune distinction de cet ordre.

Nous examinerons maintenant le détail des réactions obtenues avec les souches pathogènes en utilisant la technique sérologique puis la lysotypie.

AGGLUTINATION SPÉCIFIQUE. — Il ressort de l'examen détaillé du type sérologique de chacune des souches que les staphylocoques étudiés se répartissent en un petit nombre de groupes d'importance numérique très inégale.

Dans le tableau suivant, qui résume les résultats obtenus, nous avons groupé les souches des types I et I-II car, comme on le verra plus loin, ces deux types de souches se comportent d'une manière identique vis-à-vis des phages et, en conséquence, il n'y a pas lieu de les séparer lors d'un premier essai de classification (tableau III).

TABLEAU III.

TYPES	I, I-II	8	II-5	I-4-8	DIVERS	0
Nombre de souches . . .	55	48	5	13	3	16

Ce tableau montre bien la prédominance très nette des types I, I-II et 8 qui comprennent à eux seuls 73,5 p. 100 des souches typées. On constate aussi l'existence, d'une part, d'un type I-4-8 dont les souches possèdent à la fois les agglutinogènes des deux types principaux I et 8 et, d'autre part, d'un type II-5 (les 5 souches de ce type ont été isolées chez le même malade).

LYSOTYPE. — Nous avons constaté, au cours de ce travail, que l'on pouvait séparer les phages en deux groupes, dont l'un comprend les phages donnant des attaques fréquentes et marquées, et l'autre les phages n'agissant que sur un petit nombre de souches seulement et dont les attaques sont en général faibles et quelquefois inconstantes.

Ces résultats justifient la classification en phages majeurs et mineurs proposée par Wahl et Fouace [40].

Nous pensons même, qu'en ce qui concerne ce travail, on peut réduire le nombre des phages majeurs et nous avons finalement réparti nos souches en trois groupes en fonction de leur sensibilité aux phages suivants : 52-52 A, 3 A-3 B-3 C et 53 ; nous avons trouvé fréquemment ce dernier phage associé à 47 et rarement à 54, ce qui confirme partiellement les résultats de Wahl et Fouace.

Deux groupes complémentaires comprenaient d'une part les

souches attaquées seulement par divers phages mineurs, et d'autre part les souches qui n'étaient lysées par aucun des phages utilisés.

Assez fréquemment, nous avons trouvé, associées aux attaques par les phages des trois premiers groupes, des attaques de différents phages mineurs et en particulier du phage 68. A part celle du phage 68 qui est forte, mais paraît peu spécifique, ces attaques sont généralement faibles et peuvent varier d'un test à l'autre, ce qui explique pourquoi nous les négligerons provisoirement.

La répartition des souches étudiées dans les différents groupes se fait de la manière suivante (tableau IV) :

TABLEAU IV.

TYPES	52-52 A	53	3 A-3 B-3 C	DIVERS	0
Nombre de souches . . .	54	46	6	11	23

Ces résultats montrent que, là encore, la très grande majorité des souches se répartit en deux groupes principaux, les groupes 52-52 A et 53, et que la sensibilité aux phages 52-52 A semble exclure la sensibilité au phage 53 et réciproquement. Il y a lieu de noter par ailleurs que les 6 souches du groupe 3 A-3 B-3 C ont été isolées sur le même malade.

COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE SÉROLOGIQUE ET PAR LYSOTYPIE. — Le tableau V permet de comparer les résultats obtenus par les deux méthodes d'individualisation.

TABLEAU V.

TYPES PHAGES	TYPES SÉROLOGIE					
	I, I-II	8	II-5	I-4-8	DIVERS	0
52-52 A	49					5
53		40			I	5
3 A-3 B-3 C			5			I
DIVERS	6				2	3
0		8		13		2

On peut tirer de l'examen de ces résultats les conclusions suivantes :

1° Il existe une excellente concordance entre les types sérologiques I et I-II d'une part et le type phage 52-52 A d'autre part ;

2° Une concordance du même ordre est constatée entre le type sérologique 8 et le type phage 53 ;

3° Cinq souches sur 6 du type phage 3 A-3 B-3 C appartiennent au type sérologique II-5. Les souches de ce type ayant été isolées sur un même malade, ce résultat ne peut être généralisé pour l'instant ;

4° Les souches I-4-8, qui possèdent les deux agglutinogènes principaux, ne sont lysées par aucun des phages utilisés ;

5° Les souches des autres types sont en trop petit nombre pour que l'on puisse tirer une conclusion quelconque de leur étude.

TESTS D'INDIVIDUALISATION ET ANTIBIOGRAMME. — Nous avons recherché s'il était possible d'établir à l'intérieur du groupe des souches pathogènes une relation entre la sensibilité aux divers antibiotiques et les types déterminés par la sérologie et les phages.

Nous n'étudierons ici en détail que les souches appartenant aux deux grands groupes définis précédemment, c'est-à-dire les groupes I-II sérologie, phage 52-52 A et 8 sérologie, phage 53. Seuls, en effet, ces deux groupes sont suffisamment importants numériquement pour que leur étude permette des conclusions valables. Le tableau VI résume les résultats obtenus.

TABLEAU VI.

TYPES	SOUCHES RÉSISTANTES aux antibiotiques considérés				
	P	A	T	C	S
I, I-II, 52-52 A, 49 souches . .	39	1	1	0	16
8, 53, 40 souches	40	40	40	29	40

Ces résultats montrent qu'il existe une concordance nette entre le type des souches et leur résistance à l'auréomycine et à la terramycine. Cette relation n'est pas absolue puisqu'une souche fait exception, mais elle paraît cependant significative. Le comportement de ces souches vis-à-vis des autres antibiotiques semble au contraire indépendant du type déterminé par la sérologie et les phages.

Les souches du type I-4-8, 0 se comportent d'une façon semblable à celle du type 8,53 et sont en particulier toutes résistantes à l'auréomycine et à la terramycine.

Les 5 souches du type II-5. 3 A-3 B-3 C ont une sensibilité analogue à celle des souches du groupe I-II, 52-52 A, 2 d'entre elles sont résistantes à la pénicilline.

INDIVIDUALISATION DES SOUCHES ET ENDÉMIE STAPHYLOCOCCIQUE.

— Les questions qui se posaient à nous lorsque nous avons entrepris ce travail étaient les suivantes : détermination du taux de contamination des sujets étudiés et du nombre de souches végétant sur un même organisme ; étude des rapports pouvant s'établir entre les souches prélevées au niveau des différents appareils et celles isolées de lésions ; recherches sur les variations possibles de la flore staphylococcique.

L'examen des 31 cas étudiés permet les conclusions suivantes :

1° Le taux de contamination constaté a été de 100 p. 100. Seuls quelques examens directs de selles ont été négatifs, mais nous avons toujours trouvé du staphylocoque à la culture du prélèvement anal. On trouve habituellement 1 à 2 souches par malade, qu'il s'agisse de sujets staphylococciques ou de témoins. Sauf dans 1 cas, chacun des nourrissons était porteur d'au moins une souche de staphylocoques pathogènes.

2° On retrouve très fréquemment la même souche présentant le même type de résistance aux antibiotiques au niveau des muqueuses respiratoires et digestives. Les souches isolées de lésions n'ont pas de caractères biologiques particuliers et leur type est en général celui des souches isolées chez le même sujet au niveau des cavités naturelles. Etant donné le petit nombre de types isolés, cette constatation ne permet pas d'attribuer avec certitude une origine endogène aux lésions dont certains de ces sujets étaient porteurs.

3° Dans 4 cas, nous avons pu faire une série de prélèvements après séjour à l'hôpital (un mois environ) et traitement par les antibiotiques et en particulier par l'auroémicine. Dans ces différents cas, nous avons constaté un changement total de la flore staphylococcique avec passage de la forme sensible I-II, 52-52 A à la forme résistante 8, 53 et ceci quelle que soit l'origine du prélèvement. Les modalités possibles de cette transformation seront étudiées plus loin.

DISCUSSION.

Il nous paraît maintenant utile de revenir sur certains résultats enregistrés dans ce travail.

Un des plus frappants est la constatation du petit nombre de types individualisés, quelle que soit la méthode utilisée. Une réserve doit être faite à ce sujet du fait que les prélèvements ont été effectués dans un seul centre hospitalier (Saint-Louis-Gran-

cher). Toutefois, ces prélèvements ayant été pratiqués vingt-quatre à quarante-huit heures après l'entrée à l'hôpital, les résultats obtenus peuvent être considérés comme donnant une image assez exacte de la flore staphylococcique végétant sur les sujets habitant la large zone de recrutement de l'hôpital.

Un second point mis en évidence dans ce travail est la correspondance existant entre le type sérologique et le type déterminé par lysotypie. Cette correspondance est assez satisfaisante pour que l'on puisse penser que, très probablement, les récepteurs des agglutinines sont associés aux récepteurs des phages à la surface des bactéries.

L'existence d'une relation : type-résistance à certains antibiotiques tels que l'auroémicine et la terramycine, amène par ailleurs à se demander si une telle relation est constante ou s'il ne s'agit que d'une coïncidence. Quelques très rares exceptions, dont une notée dans ce travail, font penser qu'il s'agit sans doute plus d'une aptitude spéciale des souches du type 8-53 à acquérir la résistance, que de l'association obligatoire d'un type et d'un certain comportement vis-à-vis des antibiotiques.

Les variations du type et de la sensibilité de la flore staphylococcique constatées après séjour à l'hôpital et traitement par les antibiotiques posent enfin la question du mécanisme de cette transformation. Celle-ci peut s'expliquer soit par contamination extérieure par un staphylocoque résistant, soit par le développement d'une souche résistante présente antérieurement chez le malade et passée inaperçue lors des prélèvements, soit par passage du type sensible au type résistant par adaptation ou mutation. Les deux premières hypothèses sont difficilement vérifiables expérimentalement, mais la troisième se prête à des recherches et un travail est en cours actuellement sur ce sujet. Les premiers résultats obtenus semblent montrer qu'à moins d'admettre un comportement totalement différent des staphylocoques *in vitro* et *in vivo*, le passage d'un type à l'autre paraît peu probable.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

L'étude systématique de la flore staphylococcique de 31 nourrissons hospitalisés nous a permis de mettre en évidence certains faits concernant d'une part les caractères des staphylocoques isolés et la valeur des méthodes d'individualisation utilisées, et d'autre part le problème de l'origine et du développement de l'infection staphylococcique.

1° *Etude des staphylocoques isolés et valeur des méthodes utilisées.* — 201 souches ont été isolées qui se répartissent en 140 souches pathogènes et 61 souches non pathogènes. Les souches non pathogènes sont insensibles à l'action des 24 phages utilisés

et rarement agglutinables par l'un des 9 sérums absorbés spécifiques.

83,5 p. 100 des souches pathogènes sont au contraire sensibles aux bactériophages spécifiques et 88,5 p. 100 sont typables par la sérologie.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne montre pas de différence significative entre les deux groupes de souches, si ce n'est une plus grande variété de types de résistance dans le groupe des non pathogènes.

Quelle que soit la méthode employée : phages ou sérologie, deux types de souches nettement prédominants ont été individualisés dans le groupe des staphylocoques pathogènes. Les deux méthodes donnent des résultats concordants en ce sens qu'à un certain type sérologique correspond un certain type phage. Ces résultats semblent indiquer que les récepteurs correspondants aux agglutinines et aux phages sont associés à la surface des bactéries.

Alors que le comportement des souches des deux types vis-à-vis de la pénicilline, de la streptomycine et de la chloromycétine est variable, les souches du premier type (sérologie I, I-II, phage 52-52 A) sont, à une exception près, sensibles à l'auro-mycine et à la terramycine, alors que les souches du second (sérologie 8, phage 53) sont toutes résistantes à ces deux antibiotiques.

2° *Caractères de l'infection staphylococcique.* — Les sujets examinés étaient porteurs de staphylocoques dans 100 p. 100 des cas. Nous avons isolé, au niveau des cavités naturelles, 2 souches par malade en moyenne, et dans 30 cas sur 31, une de ces souches au moins était pathogène.

Les souches isolées de lésions ne présentaient aucun caractère les distinguant des souches pathogènes végétant au niveau de l'appareil respiratoire et digestif des nourrissons examinés.

Après traitement par les antibiotiques et séjour à l'hôpital, nous avons constaté dans les 4 cas que nous avons pu étudier un changement total de la flore staphylococcique avec passage du type sensible au type résistant. Le mécanisme de cette transformation est discuté.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. HALLMAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1937, **36**, 789.
- [2] E. GILLEPSIE, E. DEVENISH et S. COWAN. *Lancet*, 1939, **237**, 870.
- [3] J. PILLET. *Thèse Fac. Méd.*, Paris, 1948.
- [4] P. ROUNTREE, R. BARBOUR et E. THOMPSON. *Lancet*, 1951, **1**, 435.
- [5] P. OEDING. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1952, **31**, 145.
- [6] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. *Ces Annales*, 1952, **82**, 465.
- [7] J. PILLET et B. ORTA. *Ces Annales*, 1952, **82**, 488.
- [8] J. PILLET et B. ORTA. *Ces Annales*, 1953, **84**, 420.
- [9] G. WILSON et T. ATKINSON. *Lancet*, 1946, **1**, 647.
- [10] R. WAHL et J. FOUACE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 542.

- [11] R. TURPIN, J. PILLET, J. CALMELS et M^{me} J. PILLET. *Sem. Hôp.* (sous presse).
- [12] S. COWAN. *J. Path. Bact.*, 1939, **48**, 169.
- [13] R. CHRISTIE et E. KEOGH. *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 189.
- [14] G. CHAPMAN, C. BERENS, L. CURCIO et E. NILSON. *J. Bact.*, 1937, **33**, 646.
- [15] Y. CHABBERT et G. TERRIAL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 499.

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC, UTILISÉ COMME ANTIGÈNE

par F. GAVOSTO et A. FICQ (*).

*(Laboratoire de Morphologie animale. Université libre
de Bruxelles.)*

INTRODUCTION.

La nature chimique des anticorps commence maintenant à être assez bien connue : il est certain qu'il s'agit de protéines, principalement de γ -globulines, qui diffèrent des globulines sériques normales par leur propriété de se combiner spécifiquement avec l'antigène.

Les phénomènes qui président au mécanisme normal des synthèses protéiques entrent également en jeu lors de la formation des anticorps : leur chaîne peptidique, en effet, semble composée des mêmes acides aminés et en même proportion que la globuline sérique normale ; la présence de l'antigène, agissant comme un modèle, influencerait seulement la configuration spatiale de la molécule protéique (Haurowitz [21]).

L'étude des lieux et des mécanismes de la synthèse des anticorps présente donc un intérêt profond et général, puisqu'il ne s'agit que d'un cas particulier de synthèse protéique dans l'organisme vivant.

Ces problèmes ont été abordés, au cours de ces dernières années, par des techniques et suivant des modalités différentes ; mentionnons notamment :

1° L'étude des modifications morphologiques que présentent les divers organes, à la suite de l'administration de l'antigène ; en particulier, l'examen simultané des corrélations existant entre l'hyperplasie de certains systèmes cellulaires et le titre en anticorps sériques de la lymphe ou même de suspensions cellulaires peut donner d'utiles indications [11, 12, 14, 20].

2° L'étude des modifications quantitatives de la production des

(*) Manuscrit reçu le 30 octobre 1953.

anticorps à la suite du blocage ou de la destruction de certains systèmes ou de certains organes [6, 9, 31].

3° La recherche de la localisation directe de l'antigène injecté. Ce dernier procédé s'est répandu dès qu'il est devenu possible d'employer des antigènes marqués, de façon variée, afin de pouvoir les suivre au sein des tissus [3, 4, 5, 10, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 32].

ANTIGÈNES MARQUÉS CHIMIQUEMENT.

Les premières tentatives ont été faites en utilisant, comme antigène, des azoprotéines arsénées et des iodoprotéines : en analysant l'As et l'I du sang et des tissus, on a observé que l'antigène injecté disparaît rapidement du sang et qu'il se dépose en majeure partie dans la moelle, le foie et la rate [23].

En préparant des azoprotéines colorées au moyen d'azobenzidine ou d'Evans blue, il a été possible de suivre ces antigènes colorés au sein des tissus : cette technique a permis de reconnaître la présence de l'antigène dans certaines cellules du S. R. E. (1) de différents organes ; c'est le cas, par exemple, des macrophages des ganglions et de la rate [29] ; on a pu observer aussi que l'antigène se localise de façon précoce dans les cellules de Kupffer, en particulier dans leur cytoplasme [25].

L'antigène peut persister dans ces cellules pendant plusieurs mois [27] ; en ce qui concerne la localisation intracellulaire, on a pu préciser que les azoprotéines injectées se retrouvent surtout dans la fraction mitochondriale du foie [19].

En 1950, Coons et al. ont utilisé une nouvelle technique : après avoir injecté l'antigène, ils ont exposé les coupes des organes traités à l'action de l'anticorps correspondant, combiné au préalable à un composé fluorescent (isocyanate de fluorescéine). Au moyen d'un microscope à fluorescence, il leur a été possible d'observer la localisation de l'antigène dans les tissus et dans les cellules ; l'anticorps y est, en effet, précipité et il y adhère sous la forme d'un composé fluorescent.

De cette façon, ils ont pu établir que les antigènes injectés ont tendance à disparaître rapidement du sang et à se concentrer dans les tissus. A ce moment, les antigènes apparaissent dans les éléments du S. R. E., où leur concentration augmente au cours du temps.

On retrouve cependant de petites quantités de l'antigène dans les éléments lymphocytaires (ganglions, follicules de Morgagni). Il convient d'ajouter que la rapidité de la diffusion et de l'élimination, ainsi que la localisation elle-même peuvent varier notablement

(1) Système réticulo-endothélial.

selon l'antigène employé (polysaccharide du pneumocoque : Kaplan, Coons et Deane, 1950 [24] ; ovalbumine, albumine bovine, γ -globuline humaine : Coons, Leduc et Kaplan, 1951 [3] ; albumine bovine : Schiller et Schayer, Hess, 1953 ; polysaccharide du streptocoque : Schmidt, 1951 [30].

ANTIGÈNES MARQUÉS AU MOYEN D'ISOTOPES.

L'utilisation d'antigènes marqués au moyen d'un isotope radioactif, a apporté aussi d'importantes contributions à l'étude de leur localisation.

Des iodoprotéines, contenant du ^{131}I , ont été utilisées dans ce but par certains auteurs (Warren, Dixon, 1948 [32] ; Dixon, Bukantz, 1951 [40] ; Haurowitz et coll., 1951 [22] ; Francis et coll., 1952 [47]), tandis que du virus de la mosaïque du tabac, marqué au ^{32}P a été utilisé comme antigène par Libby et Madison en 1947 [26].

On a pu démontrer, de cette manière aussi, que l'antigène disparaît assez rapidement de la circulation et qu'il se concentre dans les organes où les éléments R. E. sont largement représentés. En ce qui concerne la distribution intracellulaire, on a observé (Crampton et Haurowitz, 1951 [7]) que, dans le cas du foie, l'antigène se fixe d'abord aux plus petits granules (microsomes) ; il est, par la suite, incorporé de façon stable dans les granules cytoplasmiques de plus grande taille (mitochondries).

Il est évident que les résultats obtenus jusqu'à présent à l'aide d'antigènes radioactifs n'ont qu'une valeur limitée, du fait que la radioactivité globale, décelée au moyen du compteur de Geiger-Müller, ne permet pas de localiser l'antigène par rapport à la structure histologique de l'organe.

C'est pourquoi certains auteurs (Libby et Madison [26], Warren et Dixon [32], Eisen et Sherman [43], Pressman et Eisen [28]) ont cherché à préciser la localisation de l'antigène radioactif par une méthode autoradiographique par noircissement ; mais cette technique n'a donné jusqu'à présent, que des résultats assez grossiers : elle ne permet pas, en effet, d'établir d'éventuelles corrélations entre la radioactivité et la structure fine (histologique et cytologique) des organes étudiés. Les améliorations qui ont été récemment apportées à la préparation des émulsions sensibles et à la technique autoradiographique en général permettent désormais de reconnaître les traces émises par les particules radioactives, d'en établir l'origine et d'en estimer la concentration.

Comme nous avons pu appliquer avec succès cette technique à des problèmes biologiques variés, l'incorporation d'acides aminés dans les cellules de la moelle osseuse [45], dans les réticulocytes, dans le foie [4], dans les oocytes [46], etc., il nous a semblé utile

de l'employer aussi dans le cas présent ; quelques modifications ont dû être apportées à la méthode afin de l'adapter aux recherches actuelles.

TECHNIQUES.

Nous avons utilisé comme antigène du virus de la mosaïque du tabac obtenu à partir de feuilles infectées et maintenues dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$; le virus a été ensuite cristallisé, selon la technique de Commoner et al. [2].

Avant l'injection, le virus a été mis en solution dans du milieu de Chambers et amené à pH ~ 7 . On sait que le VMT se comporte comme un bon antigène pour plusieurs mammifères, dont la souris (Libby et Madison [26]).

L'injection, par voie intraveineuse, a été faite dans la veine ventrale de la queue des souris. La quantité injectée (3,5 mg de virus dans 0,4 cm³) s'étant avérée insuffisante dans un premier essai, une dose huit fois plus considérable, environ, a été injectée aux trois autres souris (*Cfr.* p. .

Les animaux ont été sacrifiés à divers intervalles de temps : le premier après vingt-quatre heures, les autres après quatre, huit et quinze jours.

Des fragments de la rate, du foie, du rein et de ganglions ont été prélevés ; en outre des frottis du sang et de la moelle osseuse mise en suspension dans du Ringer ont été effectués.

La fixation a été faite dans de l'alcool-acétique (3 : 1) pendant une heure ; après un lavage dans l'alcool à 70°, les pièces ont été enrobées dans la paraffine et coupées à 6 ou 7 μ ; après étalement sur des lames préalablement gélatinées, elles ont été déparaffinées et réhydratées selon la technique classique.

Quant aux frottis, qu'il s'agisse du sang ou de suspensions de la moelle osseuse, ils ont été fixés pendant huit minutes à l'alcool méthylique puis séchés.

Les manipulations ultérieures ont été effectuées en chambre noire : de l'émulsion G⁵ (in gel form, Ilford) diluée aux 2/3 a été portée au bain-marie à la température de 47°, puis coulée sur la préparation, de façon à obtenir une épaisseur de 40 μ d'émulsion sèche après fixation.

L'exposition, dans une atmosphère sèche (CaCl_2) a varié de deux à cinq jours.

Le développement photographique a été effectué à l'aide d'un révélateur à l'amidol [8] dont voici la composition.

Amidol	1,125 g
Sulfite de Na, anhydre.	4,5 g
KBr, sol. 10 p. 100.	2 cm ³
Eau distillée.	250 cm ³

Après que les plaques eurent été révélées pendant vingt

minutes à 14°, elles ont été fixées à l'hyposulfite de Na (1/3 de la saturation) pendant trente minutes environ.

Un lavage soigneux à l'eau courante pendant une heure fait suite afin d'éliminer progressivement le fixateur.

C'est à ce moment que s'opère la coloration des frottis et des coupes histologiques à travers la gélatine. Après de nombreux essais, nous avons observé qu'avant de plonger les lames dans le colorant, il est souhaitable de les laisser dans de l'éthanol à 70° pendant vingt à trente minutes. L'alcool, en agissant sur l'émulsion fixée, favorise la diffusion du colorant à travers celle-ci.

Les frottis ont été colorés au Giemsa pendant environ une demi-heure, puis lavés à l'eau courante et séchés à l'air ; quant aux coupes, elles ont été colorées au mélange de Unna (vert de méthyle-pyronine) pendant une heure, puis différenciées à l'eau distillée et à l'alcool 70°.

RÉSULTATS.

Souris I.

Injection intraveineuse de 3,5 mg de virus d'une activité totale d'environ 2 800 c/min dissous dans 0,4 cm³ de milieu de Chambers.

L'animal a été sacrifié après vingt-quatre heures. L'examen a porté sur la rate, la moelle et le foie. L'exposition des lames a varié d'un minimum de deux jours à un maximum de douze jours.

Dans les lames exposées deux jours, les traces des β ne sont pas visibles ; après une exposition plus longue, le back-ground devient trop intense pour permettre des conclusions valables.

Souris II.

Nous avons utilisé, pour cette deuxième expérience, une préparation de virus, dont l'activité totale était nettement supérieure à la précédente : 7 mg de virus dissous dans 0,4 cm³ donnaient une activité de 32 000 c/min.

Après l'injection, l'animal a manifesté une dyspnée et une cyanose intenses pendant quelques minutes.

Sang. — Des prélèvements du sang ont été effectués après quinze, quatre-vingt-dix, cent quatre-vingts minutes et vingt heures. La radioactivité du sang total a été mesurée au compteur, tandis que des frottis des mêmes échantillons étaient préparés en vue de l'autoradiographie.

Les deux méthodes ont montré que la radioactivité du sang diminue de 50 p. 100 en trois heures ; après vingt-quatre heures, elle ne correspond plus qu'au tiers de la radioactivité initiale.

Les autoradiographies ont permis de préciser que les traces

d'électrons ne sortent pas des éléments figurés du sang : vraisemblablement, l'antigène se trouvait encore en solution, sans avoir été incorporé par les cellules du sang circulant.

L'animal a été sacrifié après quatre jours et l'examen des divers organes a fourni les résultats suivants.

Moelle osseuse. — Quelques traces trouvent leur origine dans les éléments jeunes de la série granuloblastique (myéloblastes et promyélocytes), mais les électrons émis par les E. R. E. (cellules

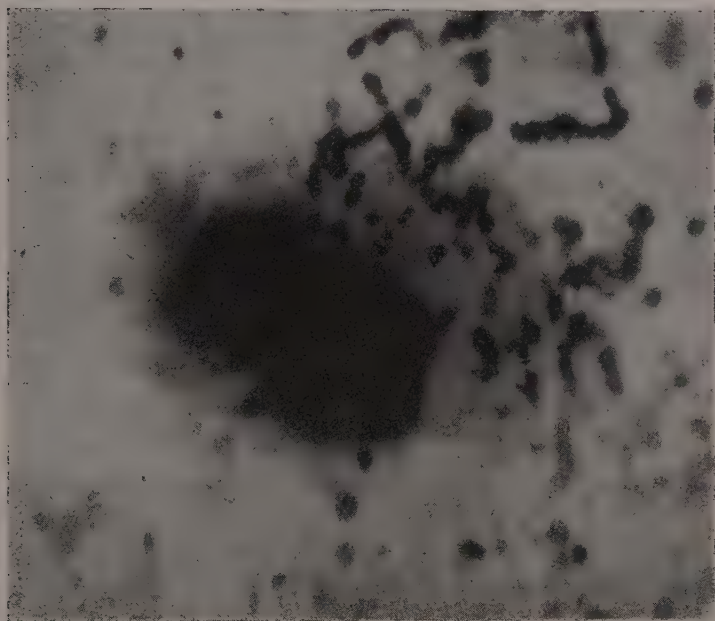


FIG. 1. — Plasmatocyte très actif de la moelle osseuse.
On voit très bien l'origine cytoplasmique des traces.

réticulaires jeunes, histiocytes, macrophages, plasmoblastes, plasmocytes) sont relativement plus nombreux.

Ces éléments R. E. présentent cependant une augmentation numérique par rapport au myélogramme normal. Certains d'entre eux émettent d'assez nombreux β (fig. 1, 2, 3), surtout d'origine cytoplasmique. Enfin, un certain nombre de traces ne sont pas en rapport avec les cellules.

Rate. — La rate est de loin l'organe le plus actif. La radio-activité est localisée surtout dans la pulpe rouge, qui présente un certain degré d'hyperplasie. En dénombrant les traces, on constate que la pulpe rouge semble sept fois plus active que la

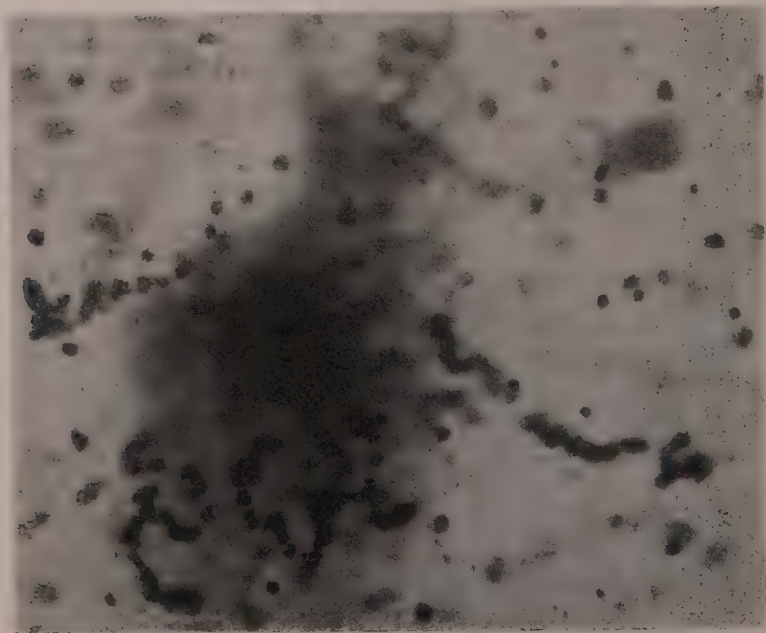


FIG. 2. — Cellule réticulaire (histiocyte) de la moelle osseuse montrant des électrons émis par le cytoplasme.

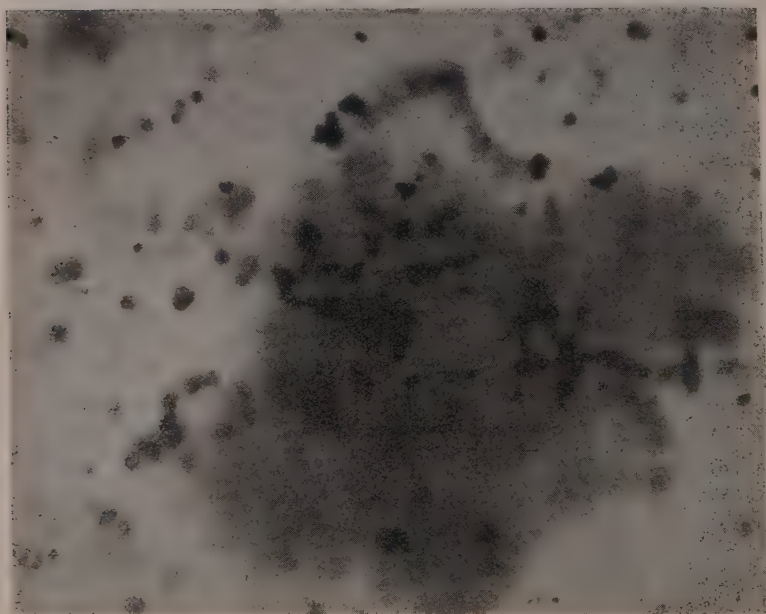


FIG. 3. — Jeune cellule réticulaire de la moelle osseuse, très active.

pulpe blanche (follicules, fig. 4). Dans cette dernière, la masse des cellules lymphocytaires est peu active ; une activité un peu plus forte s'observe dans les éléments plus jeunes, des centres clairs. Dans la pulpe rouge, les cellules réticulaires jeunes, les plasmacytes et les cellules pariétales des sinus se montrent les plus radioactives ; certaines de ces cellules peuvent émettre plus d'un électron. L'origine de la plupart des traces apparaît cytoplasmique. D'autres traces, surtout visibles dans la lumière des

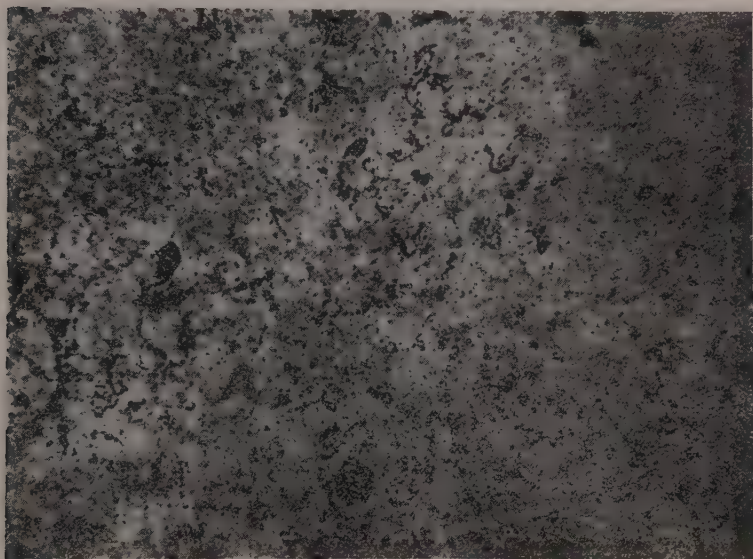


FIG. 4. — Région de la rate où l'on voit très bien la différence d'activité entre la pulpe rouge et le quadrant du follicule lymphocytaire.

sinus, ne sont pas en rapport avec les cellules : il s'agit probablement d'antigène encore en solution dans le liquide extracellulaire.

Foie. — Le tissu hépatique est le siège d'une forte activité (fig. 5), quoique moindre que celle présentée par la pulpe rouge de la rate. De nombreuses traces semblent être émises par les cellules hépatiques elles-mêmes, particulièrement par celles qui sont les plus voisines des espaces portes (périphérie du lobule).

De plus, des cellules de Kupffer, qui ne sont pas toujours aisément visibles, sont à l'origine de certains β ; mais on ne constate pas de différence notable d'activité entre les cellules

endothéliales et celles du parenchyme. Dans le foie, plus encore qu'ailleurs, l'origine des traces semble être cytoplasmique.

Ganglion. — Les ganglions que nous avons prélevés montrent une activité infiniment moindre que la rate et le foie. On peut y observer des électrons dans la région corticale et surtout dans la région médullaire, même dans les sinus lymphatiques.

Rein. — Dans cet organe également, l'activité est faible. La concentration la plus élevée de l'antigène s'observe dans les

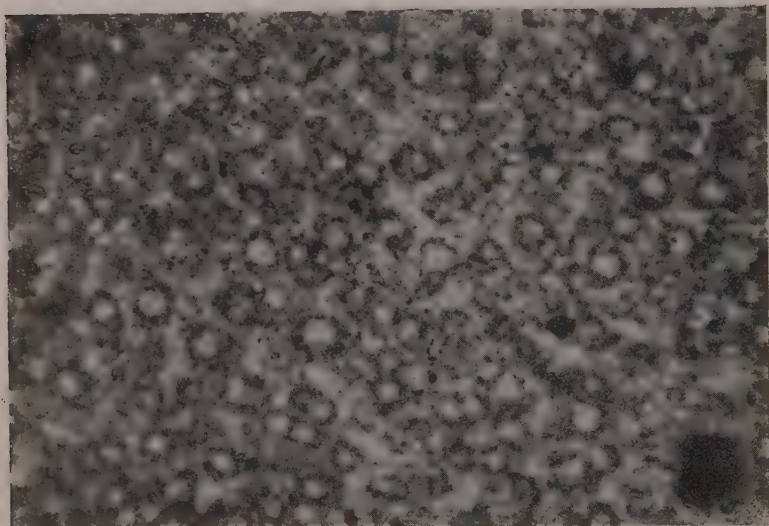


FIG. 5. — Région du foie.

petits vaisseaux sanguins et dans les glomérules de Malpighi ; mais la faible activité globale ne permet pas d'aller plus loin.

Souris III.

Une activité globale de 25 000 c/min. a été injectée à cet animal, sacrifié après huit jours.

Sang. — Le sang présente beaucoup moins de trajectoires (environ 1 : 8) que celui de la souris II (pour des préparations ayant subi une durée d'exposition identique). Les traces ne sont pas toujours en rapport avec les éléments figurés.

Moelle. — On retrouve à peu près les mêmes caractéristiques que chez l'animal précédent : les cellules R. E. représentent toujours 3 à 4 p. 100 du nombre total des cellules et elles sont incontestablement les plus actives.

Rate. — L'activité est, comme auparavant, concentrée dans la pulpe rouge (fig. 7) où l'on remarque une augmentation des plasmotocytes (fig. 6). Les follicules sont, dans l'ensemble, toujours très peu actifs; leurs centres clairs présentent un certain degré de réaction caractérisée par l'apparition de nombreuses cellules basophiles jeunes, dont certaines se trouvent en mitose.

Foie. — Dans cet organe, la diminution globale du nombre de traces semble moindre que pour les autres; les traces provenant de tous les types de cellules sont encore très nombreuses: on retrouve même encore des traces dans la lumière des petits vaisseaux.

Il n'y a pas de variations notables à signaler, par rapport aux observations précédentes, en ce qui concerne les *ganglions* et le *rein*.

Souris IV.

Animal sacrifié quinze jours après une injection d'antigène ayant une radioactivité de 25 000 c/min.

C'est dans la *rate* et le *foie* seulement que persiste un certain degré d'activité nettement inférieur d'ailleurs à ce que nous avons vu dans le cas des animaux précédents. Dans la *rate*, le contraste entre la pulpe blanche et la pulpe rouge persiste, quoique moins évident; une activité bien localisée des cellules basophiles plus ou moins mûres se retrouve, en particulier, dans la pulpe rouge.

Dans le *foie*, enfin, il semble que ce soient surtout les cellules de Kupffer qui se montrent actives.

DISCUSSION.

Parmi les différentes techniques qui ont été utilisées pour localiser les antigènes injectés dans les organismes vivants, la méthode autoradiographique, basée sur l'observation des particules individuelles émises par les radiations, paraît la plus indiquée: elle permet, en effet, de situer simultanément l'origine des traces et d'observer la structure de l'organe considéré et même des cellules qui le constituent.

Cette méthode permet, en outre, d'obtenir, ne fût-ce que grossièrement, des données quantitatives sur le degré de la radioactivité; il suffit pour cela de comparer entre eux les différents organes ou les différentes structures chez un même animal. Elle s'est avérée précieuse aussi dans la présente étude sur la localisation du virus de la mosaïque du tabac injecté par voie intraveineuse à des souris: elle a permis de préciser que cet antigène se concentre particulièrement dans la *rate*, surtout dans les

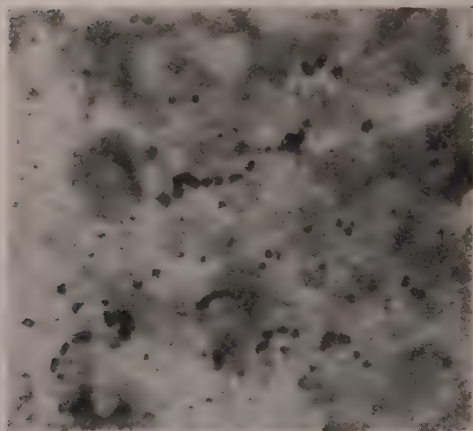


FIG. 6. — Région de la pulpe rouge de la rate riche en plasmacytes.



FIG. 7. — Région de la rate de l'animal sacrifié après 8 jours.

cellules qui constituent la pulpe rouge de l'organe, et dans le foie.

La localisation des traces par rapport aux cellules peut s'effectuer avec une exactitude suffisante, mais il faut cependant reconnaître qu'il subsiste quelques causes d'erreurs : certaines traces ne peuvent être retrouvées, soit parce qu'elles ne comportent qu'un ou deux grains d'AgBr, soit parce qu'elles sont émises perpendiculairement à la préparation ; par ailleurs, certaines traces du back-ground peuvent être confondues avec celles qui sont émises par l'antigène.

Nous avons observé, en tous cas, que l'antigène se fixe principalement dans les cellules du S. R. E., mais sans que cette localisation soit exclusive. Dès les premiers jours qui suivent son introduction, l'antigène apparaît également dans d'autres types de cellules, notamment dans les cellules hépatiques. Ces dernières demeurent assez longtemps actives, sans subir autant de variations que celles des autres organes.

Puisqu'on peut difficilement croire que ces cellules du foie ne possèdent qu'une fonction de dépôt, il est légitime d'envisager une participation, même précoce, du parenchyme hépatique à la réaction antigène-anticorps ; mais en ce qui concerne la nature même de cette participation, nous en sommes encore réduits aux hypothèses.

Il se pourrait, par exemple, que dans nos expériences où une forte incorporation se fait dans la rate, des produits de la démolition de l'antigène soient déversés dans le sang ; ils seraient entraînés par la circulation porte dans le foie, pour y être réutilisés lors des stades ultérieurs du catabolisme protéique.

Chez les animaux qui ont été sacrifiés après des temps plus longs (huitième et quinzième jours), l'antigène est encore présent, quoiqu'en quantité de plus en plus réduite, dans les mêmes types de cellules que précédemment : il s'agit, par conséquent, surtout des cellules du S. R. E. Ce fait peut donner à penser que ces cellules interviendraient dans des phénomènes postérieurs à la fixation de l'antigène : en particulier, il se pourrait qu'après une digestion préliminaire de l'antigène, il y survienne une libération des groupes (groupes déterminants) qui induisent la formation de l'anticorps.

L'antigène, après qu'il a été injecté dans la circulation, tend rapidement à passer à travers les parois vasculaires, vraisemblablement jusqu'à ce qu'il atteigne un état d'équilibre avec les liquides interstitiels.

Dans les premiers jours, beaucoup de traces trouvent leur origine dans la lumière des capillaires, des sinus et des petits vaisseaux ; mais ce phénomène persiste beaucoup plus tard et il est donc probable qu'une partie de l'antigène reste, pendant longtemps, en solution dans les liquides organiques.

La molécule de l'antigène ne peut passer, telle quelle, la barrière rénale : ainsi s'explique probablement la présence des traces dans les petits vaisseaux de l'organe et leur absence dans les tubes rénaux, au début de l'expérience.

Notons, enfin, que l'activité des ganglions, quoique le S. R. E. y soit largement représenté, demeure toujours très modérée ; on se l'explique aisément si l'on considère que ces organes sont liés à la circulation lymphatique et qu'ils sont par conséquent destinés à réagir à l'introduction de substances étrangères dans les territoires lymphatiques dont ils sont satellites ; il n'est pas surprenant que leur réaction à ces mêmes substances, injectées par la voie sanguine, soit beaucoup plus faible.

RÉSUMÉ.

Une étude de la localisation du virus de la mosaïque du tabac radioactif, utilisé comme antigène, a été entreprise par la méthode autoradiographique (émulsions nucléaires).

Quatre souris ont été injectées, par voie intraveineuse ; le virus était marqué sur le carbone.

L'antigène se fixe principalement dans la rate et dans le foie ; la concentration de l'antigène est beaucoup plus faible dans les ganglions lymphatiques et dans le rein.

Dans la rate, une localisation préférentielle s'observe dans la pulpe rouge et, en particulier, dans les cellules du système réticulo-endothélial ; ces dernières présentent des signes évidents de prolifération.

Dans le foie, l'antigène se fixe soit dans les cellules de Kupffer, soit dans les cellules parenchymateuses.

Les animaux sacrifiés les huitième et quinzième jours après l'introduction de l'antigène montrent une localisation à peu près similaire : on peut en présumer que certains processus consécutifs à la fixation de l'antigène prennent place également dans les cellules du système réticulo-endothélial.

Nous tenons à remercier M. le professeur R. Jeener de la préparation du virus radioactif de la mosaïque du tabac qu'il nous a aimablement procurée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. A. BOYD et H. LEVI. *Science*, 1950, **111**, 58.
- [2] B. COMMONER, F. MERCER, P. MERRILL et A. ZIMMER. *Arch. Biochem.*, 1950, **27**, 271.
- [3] A. H. COONS, E. H. LEDUC et M. H. KAPLAN. *J. exp. Med.*, 1951, **95**, 173.

- [4] A. H. COONS. *Feder. Proceed*, 1951, **10**, 558.
- [5] A. H. COONS et M. H. KAPLAN. *J. exper. Med.*, 1950, **91**, 1.
- [6] C. G. CRADDOCK et J. S. LAWRENCE. *J. Immunol.*, 1948, **60**, 241.
- [7] C. F. CRAMPTON et F. HAUROWITZ. *Feder. Proceed*, 1951, **10**, 405.
- [8] C. DILWORTH, G. P. S. OCCHIALINI et L. VERMAESEN. *Bull. Centre Phys. Nucl. U. L. B.*, 13 a, 1950.
- [9] F. J. DIXON, S. BUKANTZ et G. J. DAMMIN. *Science*, 1951, **113**, 274.
- [10] F. J. DIXON, S. BUKANTZ, G. J. DAMMIN et D. W. TALMAGE. *Feder. Proceed*, 1951, **10**, 553.
- [11] W. E. EHRRICH, T. N. HARRIS et E. MERTENS. *J. exper. Med.*, 1946, **83**, 373.
- [12] W. E. EHRRICH et T. N. HARRIS. *Science*, 1945, **101**, 28.
- [13] H. N. EISEN, B. SHERMAN et D. PRESSMAN. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 543.
- [14] A. FAGRAEUS. *Acta med. scand.*, 1948, **130**, suppl. 204.
- [15] A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA. *Exper. Cell Res.* (sous presse).
- [16] A. FICQ. *Experientia*, 1953, **9**, 377.
- [17] G. E. FRANCIS, J. D. HAWKINS et A. WORMALL. *II^e Congrès de Biochimie. Résumé des communications*. Paris, 1952, 389.
- [18] D. GITLIN. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1950, **74**, 138.
- [19] D. GITLIN, B. LANDING et A. WHIPPLER. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1951, **78**, 631.
- [20] T. N. HARRIS et W. E. EHRRICH. *J. exper. Med.*, 1946, **84**, 157.
- [21] F. HAUROWITZ. *Biol. Rev.*, 1952, **27**, 247.
- [22] F. HAUROWITZ, C. F. CRAMPTON et R. SOWINSKI. *Feder. Proc.*, 1951, **10**, 560.
- [23] F. HAUROWITZ et F. KRAUS. *Hoppe-Seyler Zeitschr.*, 1936, **239**, 76.
- [24] M. H. KAPLAN, A. H. COONS et H. W. DEANE. *J. exper. Med.*, 1950, **91**, 15.
- [25] H. KRUSE et P. D. MAC MASTER. *J. exper. Med.*, 1949, **90**, 425.
- [26] L. LIBBY et C. R. MADDISON. *J. Immunol.*, 1947, **55**, 15.
- [27] P. D. MAC MASTER et H. KRUSE. *Feder. Proceed*, 1951, **10**, 564.
- [28] D. PRESSMAN, H. N. EISEN, M. SIEGEL, P. J. FITZGERALD, B. SHERMAN, et A. SILVERSTEIN. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 559.
- [29] F. R. SABIN. *J. exper. Med.*, 1939, **70**, 67.
- [30] W. C. SCHMIDT. *J. exper. Med.*, 1952, **95**, 105.
- [31] W. H. TALIAFERRO et L. G. TALIAFERRO. *Science*, 1951, **113**, 473.
- [32] S. WARREN et F. DIXON. *Amer. J. med. Sci.*, 1948, **216**, 136.

LA MULTIPLICATION DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN PRÉSENCE DE STREPTOMYCINE

R. LINZ (*).

(Laboratoire de Bactériologie de l'Université Libre de Bruxelles
et Laboratoire de Biologie Clinique
de l'Hôpital Universitaire Saint-Pierre, Bruxelles.)

On admet, en général, qu'une concentration de streptomycine dite « bactériostatique » a pour effet d'empêcher complètement la multiplication des bactéries sensibles. On tire cette conclusion de l'observation à l'œil nu des cultures en milieu liquide. Si, cependant, on examine celles-ci en s'aidant de moyens plus précis, on constate qu'il existe une phase initiale de multiplication, tout au moins dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Suivons, en effet, l'évolution de germes de cette espèce dans le milieu liquide de Dubos, contenant de l'albumine et du « Tween 80 ». La culture, bien agitée, est suffisamment diffuse et homogène pour se prêter à des mesures dans un turbidimètre photo-électrique, si l'on prend certaines précautions (Linz [2]). L'intensité de la source lumineuse et l'incidence du faisceau sont maintenues constantes : nous nous contenterons de comparer entre eux divers stades d'une même culture, et ne comparerons pas entre elles des cultures différentes, où des conditions différentes pourraient rendre la comparaison aléatoire. En d'autres termes, le tambour de l'appareil sera ajusté de nouveau à 100 pour chaque culture au début de l'expérience, et nous nous contenterons de mesurer les troubles de chacun par rapport au trouble initial. Les chiffres indiqués ci-dessous sont les chiffres lus sur le tambour dans ces conditions. C'est dire qu'ils diminuent lorsque le trouble augmente, et qu'ils augmentent lorsque le trouble diminue, la cellule photo-électrique mesurant l'intensité de la lumière non absorbée par les cultures.

Dans des tubes spéciaux pour turbidimétrie, on verse successivement : 8 cm³ du milieu de culture ; 1 cm³ de solution de streptomycine, ou de solvant sans streptomycine ; et 1 cm³ d'une

(*) Manuscrit reçu le 5 septembre 1953. Ce travail a fait l'objet d'une communication au VI^e Congrès International de Microbiologie, à Rome, en septembre 1953.

culture d'une souche sensible de *M. tuberculosis* (H37Rv, BCG, E₅, etc.), bien adaptée au milieu et âgée de 7 à 10 jours. Les mesures de trouble sont faites aussitôt après la préparation des tubes (moment 0) et fréquemment pendant l'incubation à 38°, après une agitation vigoureuse. Une expérience typique est résumée dans le tableau I.

TABLEAU I. — Évolution turbidimétrique d'une culture de *M. tuberculosis* (souche sensible E₅) en milieu de Dubos, additionné de streptomycine.

Streptomycine (concentration en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Temps d'incubation à 38°											
	heures					jours						
	0	12	24	36	48	3	4	5	6	8	10	15
0 (témoin)	100	90	77	68	61	49	37	32	25	18	10	X
0.01	100	91	82	70	62	50	39	34	29	23	17	10
0.1	100	91	88	81	79	79	80	81	89	88	90	99
1	100	93	89	88	87	90	94	98	100	99	100	100
10	100	92	90	89	89	92	95	99	102	100	103	109
100	100	93	90	90	90	93	98	100	100	103	105	111

Tubes de 10 cm³, contenant 1 cm³ de culture de la souche E, en milieu de Dubos, âgée de 7 jours.

Les chiffres sont lus directement sur le tambour, ajusté à 100 pour chaque tube au moment 0. Ils diminuent lorsque le trouble augmente, et inversement.

X, trouble dépassant la limite de l'appareil.

Dans la culture témoin, sans streptomycine, le trouble augmente rapidement et atteint, vers le huitième-dixième jour, un degré qui dépasse les limites de l'appareil ajusté comme il a été dit. Les concentrations très faibles de streptomycine (par exemple, 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) ne modifient guère cette évolution. Au contraire, en présence de la concentration minimum bactériostatique (0,1 à 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, suivant les souches), le trouble du huitième jour est égal à ce qu'il était au départ. Seulement, entre temps, il avait varié, d'abord dans un sens, puis dans l'autre. En effet, pendant les deux ou trois premiers jours, il avait augmenté nettement, — à vrai dire, moins que dans le tube témoin ; il était resté inchangé ensuite pendant un à trois jours ; enfin, il avait diminué régulièrement pendant les jours suivants. Trois phases se sont donc succédé : intensification du trouble, inhibition, éclaircissement. Des concentrations de streptomycine beaucoup plus élevées ont le même résultat : même si elles sont cent à mille fois plus fortes que la concentration minimum bactériostatique, l'augmentation initiale du trouble et l'éclaircissement terminal ne manquent jamais. Ceux-ci s'estompent uniquement lorsque la semence est trop pauvre.

Ces trois phases correspondent respectivement à une multipli-

cation, à une inhibition et à une lyse des bactéries (Linz [2, 3, 4]). Comme le rappelle le tableau II, la multiplication dans les cultures additionnées de concentrations « bactériostatiques » de streptomycine double le nombre des germes ensemencés. La seule exception est celle où la concentration de l'antibiotique est très voisine de la concentration minimum bactériostatique : alors, le nombre des germes triple. Tout se passe comme si, dans le premier cas, chaque bacille s'était divisé une fois, et, dans le second cas, comme si la moitié des germes issus de cette division (c'est-à-dire le même nombre de germes que celui qui a été ensemencé) se divisaient encore une fois. Je reviendrai plus loin sur ce point.

TABLEAU II. — Nombre de bacilles (en millions) par centimètre cube des cultures du tableau I.

Streptomycine (concentration en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nombre de jours d'incubation à 38°									
	0	I	2	3	4	5	6	8	10	15
0 (témoin)	102	321	688	986	1290	1750	2210	2380	2630	2510
0.01	99	296	653	972	1320	1820	2030	2300	2550	2710
0.1	105	181	289	301	292	264	201	196	157	103
1	103	187	222	215	183	124	111	108	97	107
10	97	169	211	209	181	102	111	99	92	78
100	98	173	190	168	140	112	101	93	89	65

Les numérations montrent aussi que l'éclaircissement des cultures additionnées de streptomycine correspond également à une lyse. Celle-ci ne progresse pas indéfiniment ; elle s'arrête vers le quinzième jour, si la concentration de l'antibiotique est proche de la concentration minimum bactériostatique ; puis, le trouble ne se modifie plus jusqu'au trentième jour. Si la concentration est très élevée, la lyse avance rapidement jusqu'au dixième jour, puis s'arrête, ou bien continue à un rythme très ralenti.

Chose curieuse, lorsque la concentration de la streptomycine ne dépasse pas 10 μg environ par centimètre cube (soit dix à vingt fois la concentration minimum bactériostatique), le trouble, une fois la lyse complétée, est exactement égal au trouble initial de la culture, et le nombre des bactéries est redevenu, aux erreurs de mesure près, le nombre initialement introduit dans le milieu. Trouble et nombre de bactéries continuent à diminuer seulement lorsque la concentration de la streptomycine est de 100 à 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Sauf dans ce dernier cas, le nombre des bactéries lysées est le même que celui dont s'est accrue la semence au cours de la multiplication. Cela reste vrai lorsque le nombre des germes avait triplé, et non doublé, pendant la première phase.

Des modifications morphologiques accompagnent les modifications turbidimétriques. On ne les observe pas au microscope

optique ordinaire ni au microscope à contraste de phase, mais bien au microscope électronique.

Afin de pouvoir examiner les bactéries avec ce microscope sans que le milieu de culture masque les formes par son opacité, il faut diluer les cultures au dixième dans de l'eau bidistillée. Or, les examens portent déjà sur les cultures avant le début de leur incubation. Celles-ci doivent donc être fort riches d'emblée ; j'ai mélangé 5 cm³ d'une culture de quatre à sept jours dans le milieu liquide de Dubos, avec 5 cm³ de milieu neuf contenant les concentrations convenables de streptomycine. Il est évident qu'on introduit ainsi un volume considérable de milieu usé, mais cela ne gêne pas le développement des germes. En effet, le tableau III montre que les troubles des cultures amorcées avec

TABLEAU III. — Évolution turbidimétrique de la souche E₃ en milieu liquide de Dubos sans streptomycine.

Composition des cultures	Lectures au tambour							
	nombre de jours d'incubation à 38°							
	0	I	2	3	4	5	6	7
Milieu neuf								
9.5 cm ³ +cult. 4 jours 0.5 cm ³	100	90	73	54	20	6	X	X
9.0 cm ³ + " 1.0 cm ³	100	80	64	47	16	4	X	X
18.0 cm ³ + " 2.0 cm ³	100	84	70	60	43	32	27	24
5.0 cm ³ + " 5.0 cm ³	100	72	56	40	16	5	X	X
9.0 cm ³ +cult. 10 jours 1 cm ³	100	79	58	44	33	20	6	X
9.0 cm ³ +cult. 47 jours 1 cm ³	100	84	62	45	36	23	8	X

1/20, 1/10 ou 1/2 volume de culture âgée de 4 à 10 jours progressent avec une rapidité comparable ; évidemment, les troubles ne sont pas équivalents, mais ce sont les accroissements relatifs qu'on mesure en ajustant pour chacun le tambour à la graduation 100 au début de l'expérience. On voit également que l'âge de la semence importe peu. Seule la profondeur du liquide de culture a une influence nette : plus elle est considérable, plus le développement est lent (comparez les cultures de 20 cm³ et de 10 cm³, dans des tubes de sections égales). Des expériences semblables montrent aussi qu'un ensemencement riche ne modifie pas essentiellement la succession des trois phases dans les cultures additionnées de streptomycine.

On prépare donc des tubes contenant 5 cm³ de culture d'une souche sensible, et 5 cm³ de milieu de Dubos avec ou sans streptomycine. Pour chaque concentration, on dispose 4 tubes identiques. On mesure les troubles de chacun et on y prélève, une ou deux fois par jour, des échantillons de 0,1 cm³ ; leur volume sera peu altéré. Les échantillons de tubes identiques sont mélangés, puis chauffés trente minutes au bain-marie à 84-86°,

ou traités par l'acide osmique ; ils ont parfois été utilisés à l'état frais : les aspects observés ont toujours été les mêmes. Après dilution au dixième en eau bidistillée, on étale une gouttelette sur membrane de collodion portée par une grille ; on laisse sécher sans ombrer (Linz [6]).

Les images trouvées au microscope électronique (1) dans les cultures témoins, sans streptomycine, sont les suivantes. Les bacilles des cultures jeunes (neuf à soixante-douze heures) se présentent comme des bâtonnets sombres de $2,5$ à $4\ \mu \times 0,5\ \mu$, renfermant des granulations arrondies [diamètre, $0,1$ à $0,4\ \mu$]

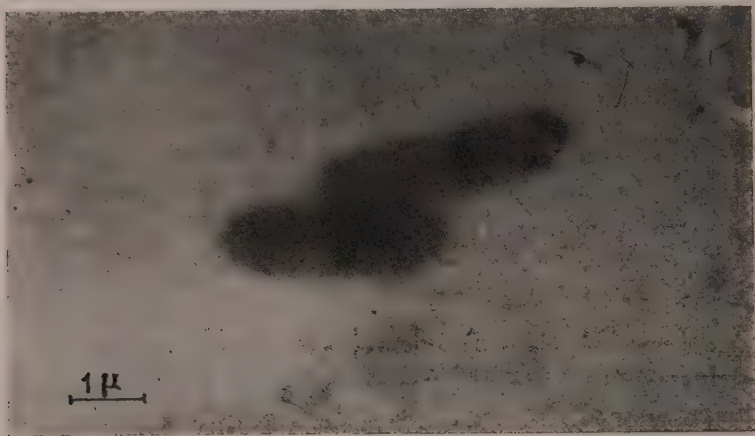


FIG. 1. — Bacilles sombres (Souche E₅; pas de streptomycine; culture de vingt-quatre heures à 38°.)

(fig. 1). A partir du cinquième jour, le corps de nombreux bacilles s'éclaircit et s'allonge ($4,5$ à $5\ \mu \times 0,5\ \mu$) ; mais les granulations restent bien marquées, seule leur structure paraît moins homogène, plus tourmentée. Le germe prend ainsi un aspect bigarré (fig. 2). Dès ce moment, mais surtout à partir des dixième-quinzième jours, apparaissent un petit nombre de bâtonnets pâles (mêmes dimensions), qu'on dirait vidés de leur substance, et où même les granulations sont estompées (fig. 3). En même temps, les bacilles sombres deviennent plus rares et les bacilles bigarrés plus fréquents. Vers les dixième-vingtième

(1) Les examens au microscope électronique n'ont été rendus possibles que grâce à l'obligeance et au dévouement de M. le Professeur De Keyser et de M. Degueldre, du Laboratoire de Chimie industrielle de l'Université libre de Bruxelles. Je les remercie bien vivement.

jours, on aperçoit de rares sphérules libres dans le milieu ; elles ont la même taille (diamètre, 0,1 à 0,4 μ) et sont aussi foncées que les granulations à l'intérieur des bacilles bigarrés (fig. 4). Rosenblatt et coll. [9], Werner [13] et Ruziczka et Orth [10] ont observé des aspects semblables.

Bacilles sombres, bacilles bigarrés, bacilles pâles et sphérules libres, voilà les divers aspects que présente *M. tuberculosis* dans les cultures en milieu de Dubos. Le moment de leur apparition, leur forme, leur taille permettent de les classer : les bacilles

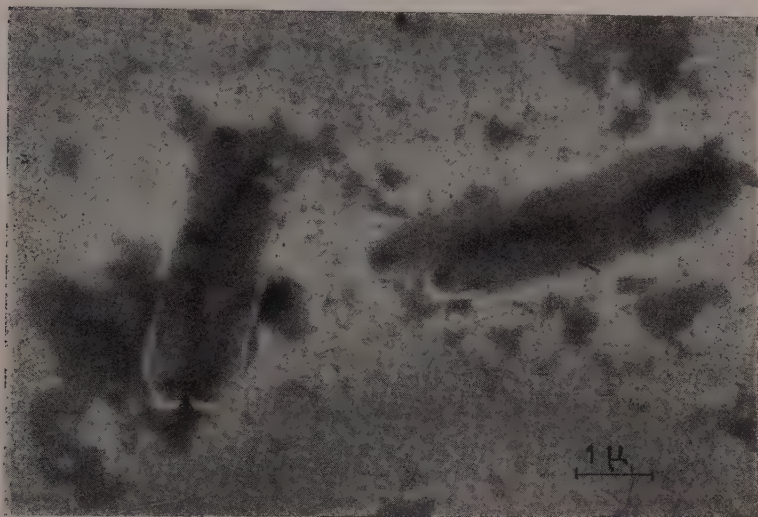


FIG. 2. — Bacilles bigarrés. (Souche E₅ ; pas de streptomycine ; culture de six jours.)

sombres sont des bacilles jeunes ; les bacilles bigarrés sont plus âgés, mais toujours actifs ; les bacilles pâles sont en voie de lyse ; les sphérules libres proviennent probablement des granulations intrabacillaires lors de la rupture des bâtonnets. Une image suggestive montre un bacille pâle achevant sa lyse : il se fond dans le milieu, et seules ses granulations, ressemblant aux sphérules libres, se voient encore, maintenues en ligne par un reste de corps bacillaire. Remarquons que les bacilles pâles, d'ailleurs très rares, sont toujours attachés par un pôle ou une face à des bacilles sombres ou bigarrés, avec lesquels ils forment paires.

Lorsque la semence est constituée par une culture de *M. tuberculosis* âgée de plus de sept jours, on trouve des bacilles longs et bigarrés et quelques bacilles pâles dans la nouvelle culture.

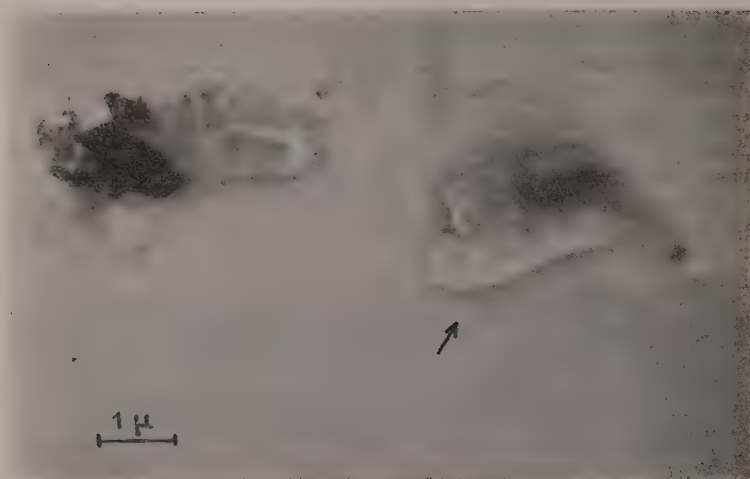


FIG. 3. — Bacille pâle et bacilles bigarrés. (Souche E₅; streptomycine 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; culture de trois jours.)

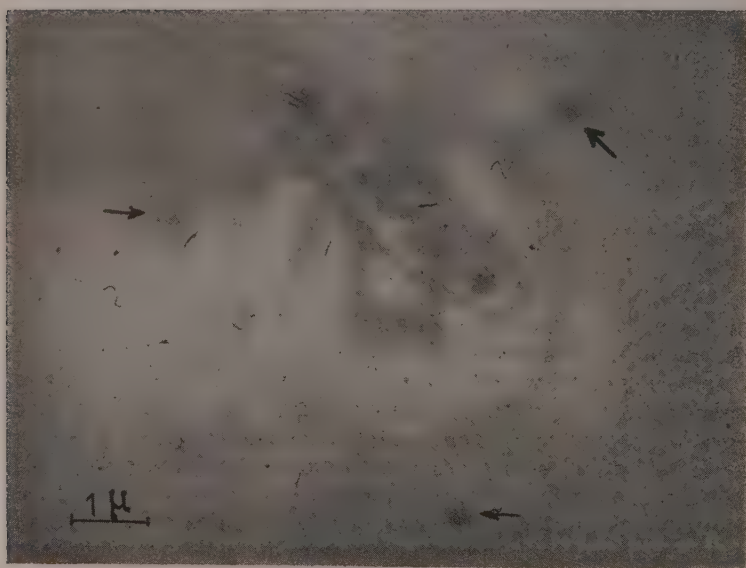


FIG. 4. — Sphérules libres et un bacille bigarré. (Souche E₅; streptomycine 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; culture de neuf jours.)

Mais ceux-ci ont presque disparu dès la neuvième heure d'incubation à 38°.

Dans les cultures en milieu de Dubos additionné de streptomycine à concentration sub-bactériostatique, les mêmes images que précédemment sont retrouvées. Elles se retrouvent encore lorsque la concentration de l'antibiotique est bactériostatique, mais avec les différences suivantes. Les bacilles bigarrés, les bacilles pâles et les sphérules libres apparaissent plus précocement : les bacilles bigarrés, le deuxième-troisième jour ; les bacilles pâles, dès le troisième jour ; les sphérules, le cinquième jour. Ils ont la

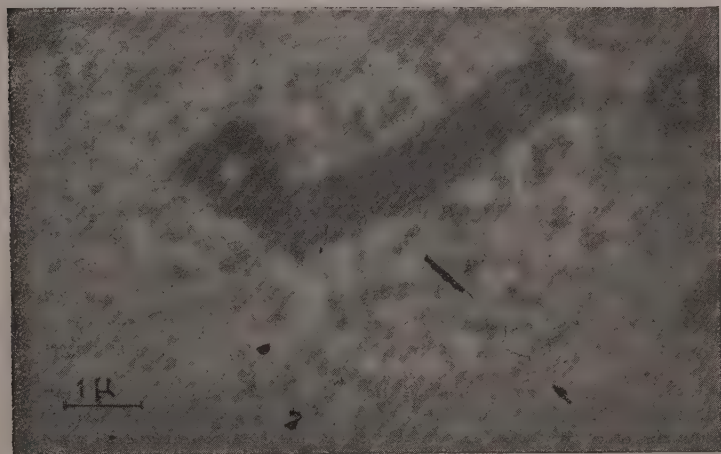


FIG. 5. — Corps en fer à cheval. (Souche E_5 ; streptomycine $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; cinq jours à 38°.)

même taille. Les bacilles bigarrés introduits avec la semence disparaissent lentement ; il en reste après trente-trois heures de culture. Loin d'être rares, les bacilles pâles et les sphérules libres sont très nombreux ; vers le dixième jour, les bacilles pâles constituent la majorité. Tant que les bacilles sombres et bigarrés ne représentent pas moins de la moitié environ des bâtonnets, les bacilles pâles forment paire avec eux (accolement par un pôle ou une face) ; plus tard, des amas peuvent être composés uniquement par des bacilles pâles. Enfin, les cultures additionnées de streptomycine contiennent des formes très particulières : des éléments courbés, en fer à cheval, qui apparaissent vers le cinquième jour [longueur, $0,3$ à 3μ ; largeur, $0,05$ à $0,4 \mu$] (fig. 5). Leur signification reste mystérieuse ; mais on peut affirmer qu'il n'y en a jamais, ni dans une solution de streptomycine dans le milieu de culture nonensemencé, ni dans les

cultures témoins de *M. tuberculosis* sans streptomycine. Ils résultent donc de l'inter-action des germes et de l'antibiotique. Peut-être dérivent-ils des granulations des bacilles bigarrés : celles-ci semblent souvent formées par des cordons tordus ; il suffirait de dérouler les cordons pour obtenir l'aspect des corps en fer à cheval. Ruziczka et Orth, cultivant la souche H37Rv sur milieu de Hohn avec streptomycine, ont observé des formes probablement identiques avec les bacilles sombres et les bacilles bigarrés ; mais ils ne décrivent ni bacilles pâles, ni sphérules libres, ni corps en fer à cheval.

Récapitulons : On trouve : 1° dans les cultures sans streptomycine, des bacilles sombres, bigarrés et pâles, et des sphérules libres, ces deux derniers étant rares ; 2° dans les cultures contenant des concentrations bactériostatiques de streptomycine, les mêmes formes, mais les bacilles pâles et les sphérules libres sont nombreux ; en outre, il y a des corps en fer à cheval. En somme, si l'on excepte ces derniers, rien n'existe dans les cultures avec streptomycine qui n'existe aussi dans les cultures témoins, mais les formes en lyse sont beaucoup plus fréquentes dans les premières. On peut dire que la streptomycine intensifie considérablement les processus normaux de lyse de *M. tuberculosis*.

Etablissons maintenant la correspondance chronologique entre l'évolution turbidimétrique d'une culture additionnée de streptomycine et l'évolution morphologique de ses germes (tableau IV).

TABLEAU IV. — Correspondance chronologique entre l'évolution turbidimétrique et l'évolution morphologique d'une culture de *M. tuberculosis* (souche sensible E₅) additionnée de streptomycine (1 µg/c n³).

TEMPS D'INCUBATION à 38°	ÉVOLUTION turbidimétrique	ÉVOLUTION MORPHOLOGIQUE (microscope électronique)
0 minute.		B. bigarrés, rares b. sombres (+).
12 à 48 heures. . .	Multiplication.	B. sombres.
3 jours	Inhibition.	Nombreux b. sombres et bigarrés ; rares b. pâles.
4 jours	Début de lyse.	Comme à 3 jours, mais b. pâles plus nombreux.
5 à 8 jours.	Lyse progressive	Les b. sombres se raréfient : les b. bigarrés et pâles sont nombreux. Sphérules libres. Corps en fer à cheval.
Plus de 8 jours . .	Fin de la lyse (trouble = double du moment 0).	Comme précédemment, mais b. som- bres devenus très rares.

(+) Les bacilles bigarrés introduits avec la semence (âgée de 7 jours) n'auront pas tous disparu à la trente-troisième heure.

Elle confirme en tous points les conclusions précédentes : les

bacilles pâles font leur apparition au moment où la multiplication cesse, ils augmentent en nombre au fur et à mesure que la lyse progresse ; les sphérules libres et les corps en fer à cheval accompagnent également la lyse ; à la fin de celle-ci, presque tous les corps bacillaires sont devenus pâles.

★★

L'action de la streptomycine sur des variants de *M. tuberculosis*, résistant à son effet bactériostatique, est trop complexe pour pouvoir l'examiner ici. Elle n'apporte d'ailleurs rien de spécial du point de vue qui nous occupe.

★★

Deux caractères de l'action de la streptomycine sur les souches sensibles de *M. tuberculosis* méritent d'être soulignés : la multiplication des germes dans une phase initiale, et la lyse qui lui fait suite. Wallace et coll. [42] avaient déjà signalé la multiplication passagère de bactéries à croissance rapide dans des milieux de culture additionnés de concentrations de streptomycine dites inhibitrices. Dans le cas du bacille tuberculeux, la multiplication est suivie d'une lyse certaine. La streptomycine exalte des processus lytiques normaux et fait apparaître des corps en fer à cheval dont la signification n'est pas élucidée, mais qui sont en relation probable avec la lyse. D'autres substances lysent les cultures de *M. tuberculosis* : l'hydrazide isonicotinique, divers antiseptiques, etc. (Linz et Lecocq [8]). Seul l'hydrazide isonicotinique partage avec la streptomycine la propriété de permettre d'abord une multiplication (Linz [2]).

La streptomycine ne paraît pas altérer la première division des bacilles ensemencés ; les images au microscope électronique ne diffèrent guère de celles des cultures témoins. Elle ralentit à peine cette division. Le fait que chaque germe se divise une seule fois (certains germes deux fois, si la concentration de l'antibiotique est suffisamment faible) s'explique-t-il par une action inhibitrice développée au cours ou à la fin de cette division ? On serait tenté de le croire. Mais cette hypothèse s'accorde mal avec deux observations, faites, à vrai dire, sur des bactéries autres que *M. tuberculosis* : 1° la streptomycine est bactéricide pour des suspensions de bactéries non proliférantes (Strauss) ; 2° elle fait apparaître des variants résistants dans de telles suspensions (Linz et Lecocq [7]).

On sait que son action bactériostatique sur *M. tuberculosis* devient irréversible après une période de trois à quatre jours (Linz [5]), période dont la longueur correspond grossièrement

avec celle de la période précédant la lyse. Doit-on conclure que c'est la lenteur de cette action qui permet aux cellules de se multiplier d'abord ? On peut en douter puisque, dans les mêmes conditions, l'action de l'hydrazide isonicotinique devient irréversible après un jour (Linz [1]), bien que la période de multiplication soit aussi longue que pour la streptomycine.

Revenons sur un fait très étrange. Dans le milieu contenant de la streptomycine à concentration « bactériostatique », le nombre des bacilles ensemencés double, ou triple parfois, au cours de la phase de multiplication initiale ; et lorsque la lyse est arrivée à son terme, on retrouve, en général, autant de bacilles qu'on en avait ensemencés. Il faut que la concentration de la streptomycine soit cent à mille fois plus élevée que la concentration minimum bactériostatique, pour que la lyse dépasse ce stade et que le nombre de bacilles tombe au-dessous du nombre initial. Sauf ce cas extrême, la lyse ne semble donc frapper que la portion dont s'est accrue la population ensemencée. On est tenté de dire qu'elle touche les bacilles « nouvellement apparus » et non les « anciens » introduits au début dans le milieu. En effet, que la population double ou triple d'abord, le résultat est le même ; la lyse ramène au nombre initial, et elle détruit pour cela plus ou moins de germes. Les « anciens » ne sont cependant pas complètement à l'abri, puisqu'ils peuvent être lysés tardivement par des concentrations énormes de streptomycine.

Bacilles « anciens » et « nouveaux » ? Que signifie cette distinction ? N'admet-on pas que les deux individus issus de la division d'une bactérie ont des potentialités égales ? Il est un fait, cependant, que la lyse par la streptomycine n'atteint qu'une partie des bacilles tuberculeux, dans les conditions habituelles. En outre, l'examen des images obtenues au microscope électronique montre qu'au début, la lyse distingue certains germes des autres : les bacilles pâles ne sont pas répartis au hasard, tantôt côte à côte, tantôt séparés, mais sont toujours couplés avec des bacilles bigarrés, parfois avec des bacilles sombres, jamais avec d'autres bacilles pâles. Chacun est attaché par un pôle ou par une face à un bacille non lysé, qu'il s'agisse de groupes de deux germes ou bien de groupes plus nombreux. Il faut attendre que la culture vieillisse pour que plusieurs bacilles pâles soient accolés l'un à l'autre ; de pareilles images ne se voient que lorsque les bacilles pâles forment environ la moitié de la population.

On ne peut objecter que tout cela est un pur effet du hasard, que les bacilles pâles sont rares au début, que la probabilité d'en trouver deux dans un même champ microscopique est faible, et que la probabilité de les trouver unis est plus faible encore. Un tel raisonnement ne s'applique plus à des cultures avec streptomycine âgées : les bacilles pâles sont devenus nombreux, on en trouve plusieurs par champ microscopique ; et cependant, tant

que les bacilles non lysés constituent la majorité, les bacilles pâles forment paire avec eux.

Tout se passe donc comme si l'un des germes d'une paire se lysait avant l'autre. Les deux individus issus d'une division seraient doués de sensibilités différentes à la lyse par la streptomycine. Le plus résistant se lyse cependant lorsqu'on prolonge l'incubation ou bien lorsqu'on le traite par des concentrations plus fortes de l'antibiotique.

Rappelons que le nombre de résistants à la lyse, pour une semence donnée, est constant : il équivaut précisément au nombre de bacilles ensemencés ; peu importe que celui-ci ait doublé ou triplé au cours de la multiplication initiale. Ce fait suggère que ce sont bien les bacilles introduits dans le milieu qui subsistent, leur division leur conserverait intactes leurs propriétés, alors que les autres germes issus d'eux, indistinguables par ailleurs, sont plus aisément lysés. Les deux bactéries ne seraient pas « sœurs », mais « mère » et « fille ».

De quels individus dérivent les cellules résistantes à l'action bactériostatique de la streptomycine et qui apparaissent sous l'influence de celle-ci ? Il est impossible de le dire. Les germes lysés (bacilles pâles, sphérules libres) ne sont pas nécessairement incapables de se multiplier ultérieurement, et les germes non lysés ne résistent pas nécessairement à l'action inhibitrice parce qu'ils ont réussi une fois à échapper à la lyse. La présence de la streptomycine n'a empêché aucun des bacilles présents de se multiplier, semble-t-il. Elle ne paraît pas sélectionner à ce premier stade. Il se peut que la sélection de mutants résistants spontanés intervienne plus tard, mais il se peut également que la résistance soit conférée à des cellules dont le métabolisme est modifié pendant leurs processus de multiplication.

CONCLUSIONS.

1° Des concentrations bactériostatiques de streptomycine n'empêchent pas *M. tuberculosis* de se multiplier passagèrement, de sorte que la population double ou triple.

2° Une phase de lyse fait suite à cette multiplication. Elle ramène habituellement le nombre de bactéries au nombre initial introduit dans le milieu au début de l'expérience.

3° Les germes affectent divers aspects au microscope électronique : bâtonnets sombres, bigarrés et pâles, sphérules libres, corps en fer à cheval. Les bâtonnets pâles et les sphérules libres sont des formes de lyse. Les corps en fer à cheval sont probablement liés à la lyse également.

4° La streptomycine semble avant tout intensifier les processus normaux de lyse de *M. tuberculosis*. Le moment de son action est discuté.

5° Le nombre des bactéries lysées est généralement égal à l'accroissement de la population pendant la phase de multiplication. Les bacilles pâles restent longtemps couplés avec des bacilles normaux. Ces deux faits suggèrent que les deux individus issus d'une division bactérienne ont des potentialités inégales et que l'un d'eux est moins sensible à la lyse par la streptomycine que l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1449.
- [2] R. LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1636.
- [3] R. LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1820.
- [4] R. LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 518.
- [5] R. LINZ. *Ces Annales*, 1953, 85, 295.
- [6] R. LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1505 et 1510.
- [7] R. LINZ et E. LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **144**, 1282.
- [8] R. LINZ et E. LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 925.
- [9] M. B. ROSENBLATT, E. F. FULLAM et A. E. GESSLER. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1942, **46**, 587.
- [10] O. RUZICZKA et E. ORTH. *Ces Annales*, 1952, **82**, 334.
- [11] E. STRAUSS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **64**, 97.
- [12] G. I. WALLACE, J. RHYMER, O. GIBSON et M. SHATTUCK. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **60**, 363.
- [13] G. H. WERNER. *Schweiz. Zeitschr. Tuberk.*, 1951, **5**, suppl., 53-90.

NOUVEAUX ASPECTS DE L'ACTION ANTITOXIQUE DE LA CORTISONE

par L. CHEDID, F. BOYER et MICHELINE SAVIARD (*).

(Collège de France, Laboratoire d'Endocrinologie.
Institut Pasteur, service de Chimie Thérapeutique B.)

Malgré son action antitoxique certaine, la cortisone [1, 2, 3], en traitement prolongé, favorise l'infection ; c'est là une limitation importante de son emploi. Nous avons eu l'occasion de signaler brièvement ce phénomène chez le rat infecté par *Salmonella enteritidis* (var. Danysz). Nous consignons ici les détails de cette expérimentation.

Il est possible de provoquer une véritable typhoïde expérimentale chez le rat, en lui administrant ce germe par voie buccale. Dans ces conditions, cette infection n'est mortelle que dans 15 p. 100 des cas. Au contraire, si cet animal a été préalablement surrénalectomisé, la mortalité, dans le même laps de temps s'élève considérablement.

On peut obtenir des résultats analogues en traitant les animaux pendant plusieurs jours avec de la cortisone.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Des rats pesant de 100 à 120 g ont reçu de la cortisone par voie sous-cutanée pendant plusieurs jours. Le deuxième jour après le début du traitement, ces animaux sont infectés avec 1 cm³ de culture de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz), soit environ 4 milliards de germes.

Le contrôle de l'infection a été fait pour chaque animal dès sa mort. A l'autopsie, les animaux présentent très souvent un aspect caractéristique : congestion des viscères, épithélium intestinal aminci et rempli de matières séro-sanguinolentes, parfois même des plaques de Peyer hémorragiques. La cortisone ne semble pas s'opposer à ces lésions [4]. Cependant, chez les animaux traités, la rate ne paraît pas augmenter de volume. La culture du sang du cœur et de la rate est positive et les germes isolés sont agglutinés par le sérum spécifique. Les rats ont donc succombé à l'infection provoquée par le germe inoculé (fig. 1).

De l'examen de cette figure, il ressort que :

(*) Manuscrit reçu le 13 novembre 1953.

1° Les animaux traités ont moins bien résisté que les témoins :
 2° La dépression de l'organisme dépend plus de la durée du traitement que de l'importance des doses administrées.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Dans cette expérience, les rats ont reçu par voie sous-cutanée 5 mg de cortisone par jour pendant huit jours. Ils ont été infectés dans les conditions habituelles le deuxième jour après le début du traitement.

Après huit jours de traitement à la cortisone, soit six jours après l'infection, tous les rats ont été mis à jeun vingt-quatre heures et sacrifiés sous anesthésie au nembutal. Le sang a été

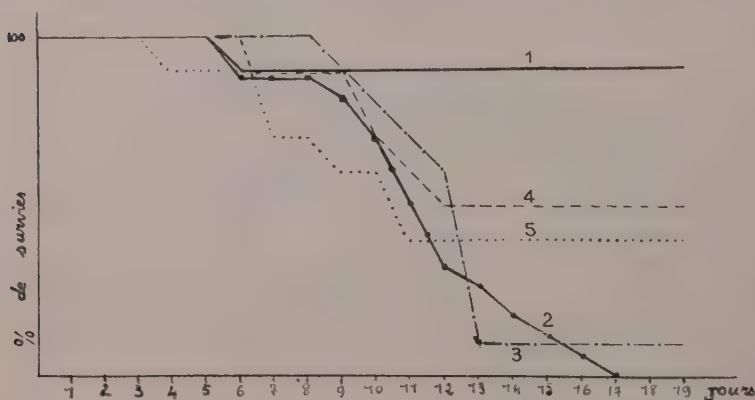


FIG. 1. — En abscisses : nombre de jours. En ordonnées : pourcentage de survies. 1 ———, Témoins. 2 ———, Cortisone 5 mg une fois par jour (12 jours). 3 ———, Cortisone 4 mg deux fois par jour (12 jours). 4 ———, Cortisone 0,5 mg une fois par jour (8 jours). 5 ———, Cortisone 5 mg une fois par jour (8 jours).

recueilli après section des carotides et le foie prélevé immédiatement et traité par la méthode de Good, Kramer et Somogyi modifiée par Pabst et coll. afin de doser le glycogène [5, 6]. L'acide ascorbique a été extrait de surrénales et dosé par la méthode de Sayers et coll. [7].

RÉSULTATS. — 1° Tous les animaux traités ont maigri sous l'action de la cortisone, tandis que les témoins infectés dans les mêmes conditions, mais non traités, ont conservé et même parfois augmenté leur poids.

2° Les surrénales ont augmenté de poids et de volume sous l'effet de l'infection ; au contraire, chez les animaux traités, on constate une diminution très marquée du poids de cette glande. Les poids absolus sont différents suivant le sexe de l'animal.

Poids moyen des surrénales.

	TÉMOINS non infectés	TÉMOINS infectés	TRAITÉS CORTISONE
♂	20 mg	28,5 mg	11,5 mg
♀	34 mg	41 mg	22 mg

3° Les variations du taux d'acide ascorbique ne nous ont donné aucune indication à retenir. Au contraire, le glycogène hépatique, déjà augmenté sous l'effet de l'infection, l'est plus encore par le traitement à la cortisone.

**Taux moyen du glycogène hépatique
en milligrammes pour 100 g de poids d'animal.**

	TÉMOINS non infectés	TÉMOINS infectés	TRAITÉS CORTISONE
♂	1,7	3	18
♀	3,7	6,6	15,4

On sait qu'il existe des rapports étroits entre surrénales et sexualité (1). Cependant, ces différences (poids des surrénales et glycogène hépatique) ne se sont jamais traduites dans nos expériences par une différence de résistance tant à l'égard du germe que de son endotoxine. Par ailleurs, des injections d'œstradiol ne modifient pas la résistance de la souris à la toxine.

4° Sous l'action de la cortisone, aucun de ces animaux n'a présenté d'hyperglycémie. Nous avons recherché cependant s'il était possible de s'opposer à l'action déprimante du traitement prolongé à la cortisone en lui associant l'insuline.

Il existe de nombreuses interrelations entre ces deux hormones. L'animal surrénalectomisé est plus sensible à l'insuline [9, 10, 11, 12]. La cortisone est diabétogène dans certaines conditions [13, 14, 15]. Par ailleurs, la résistance à l'infection est très diminuée chez les diabétiques, comme elle l'est aussi chez les animaux soumis à la cortisone pendant longtemps. Récemment, des auteurs ont réussi à infecter des rats résistant à la tuberculose, soit en les traitant par la cortisone, soit en provoquant chez ces animaux un diabète alloxanique [16]. De tous

(1) On trouvera cette question traitée en détail dans la revue faite récemment par R. Courrier et ses collaborateurs [8].

ces faits, on peut rapprocher la constatation de Grattan et Jensen [47]. Ces auteurs ont signalé qu'en plus de leur action glycogénique au niveau du foie, les gluco-procorticoïdes s'opposent aux convulsions provoquées par l'insuline chez la souris.

Dans ces conditions, est-il possible de diminuer les effets nocifs de la cortisone par l'administration d'insuline ?

Bien que dans l'une de nos expériences, l'association de l'insuline à la cortisone ait diminué nettement la mortalité qui résulte de l'hypercortinémie prolongée, il ne nous semble pas que le rôle diabétogène du composé E soit en cause. Rappelons d'ailleurs que nous n'avons jamais observé d'hyperglycémie chez les rats traités.

★★

On sait qu'à l'opposé de son action pro-infectieuse, la cortisone, administrée dans certaines conditions, augmente la résistance de l'animal vis-à-vis de différents germes et surtout de leur antigène glucido-lipidique.

Dans un précédent mémoire [2], nous avons émis l'hypothèse suivante : la cortisone « ne neutralise pas directement le poison microbien, mais agit vraisemblablement sur un récepteur périphérique qui est capable de s'opposer à l'action de la toxine ».

Il nous a paru intéressant de rechercher si cette hormone manifestait son action en l'absence de différents organes importants : tels que le foie, la rate, le thymus, etc.

Nous savons que, si la cortisone est active vis-à-vis des endotoxines, elle est par contre inactive vis-à-vis des exotoxines [3]. Dans toutes nos expériences, nous avons injecté les endotoxines par voie intrapéritonéale et les exotoxines par voie sous-cutanée ou intramusculaire. L'action de l'hormone était-elle liée au mode d'inoculation ? Gale et Elberg [48] ont montré que certaines substances, comme la mucine, modifient la virulence de divers agents bactériens par leur action sur la perméabilité du péritoine. Le composé E n'agit pas cependant par ce mécanisme, car si l'on injecte la toxine tétanique par voie intrapéritonéale, la cortisone demeure sans action, tandis qu'elle continue à protéger la souris vis-à-vis de l'endotoxine d'*Escherichia coli*, même quand cette dernière est injectée par voie intraveineuse.

Nous avons utilisé la voie intraveineuse, car l'antigène glucido-lipidique n'est toxique qu'à de très fortes doses par voie sous-cutanée et demeure complètement inactif par voie buccale. Pour Boivin, ce fait est étonnant, l'endotoxine n'étant pas de nature protéique, sa destruction par les sucs digestifs est difficile à imaginer. Il existerait, pour cet auteur, un enzyme dans l'épithélium intestinal [49, 20].

A. RÔLE DU FOIE. — On sait qu'un grand nombre d'hormones stéroïdes administrées par voie buccale sont inactivées parce qu'elles sont détruites par la cellule hépatique. Bien que certains auteurs aient signalé la destruction de la cortisone *in vitro* par le foie [21], de nombreuses observations cliniques mettent en évidence une activité au moins égale lorsque cette hormone est administrée par la bouche [22, 23]. Cette activité s'expliquerait par une transformation du composé E en composé F [24]. Nous-mêmes avons toujours constaté une action tout aussi efficace vis-à-vis de l'antigène glucido-lipidique lorsque le composé E est administré par cette voie à la souris.

Il ne semble pas que le foie joue un rôle important dans la détoxification de l'endotoxine.

1° *Toxicité de l'antigène glucido-lipidique injecté par voie intrasplénique.* — Toute substance introduite dans la rate est entraînée entièrement vers le foie. Administrée dans ces conditions, si cette substance est détoxifiée par la cellule hépatique, il faut considérablement augmenter la dose pour obtenir le même effet que par voie générale. En ce qui concerne l'antigène glucido-lipidique, il suffit d'injecter 0,5 mg dans la rate pour tuer le rat dans les mêmes délais que par voie intraveineuse.

La surrénalectomie augmente considérablement la sensibilité à l'endotoxine ; en est-il de même lorsque cette dernière est injectée par voie intrasplénique ?

Dix souris surrénalectomisées depuis trois jours sont divisées en deux lots :

Cinq souris reçoivent 0,1 mg d'antigène (2) par voie intraveineuse.

Les cinq autres reçoivent la même dose dans la rate. Tous les animaux meurent en quelques heures.

A l'examen histologique, les lésions sont déjà considérables au niveau de divers organes : elles semblent s'établir plus tôt lorsque l'on introduit l'antigène par voie intrasplénique.

Ainsi, le foie ne paraît pas jouer un rôle immédiat dans la détoxification de l'antigène, puisque l'injection par cette voie ne diminue pas sa toxicité aussi bien chez le rat normal, que chez la souris surrénalectomisée.

2° *Action antitoxique de la cortisone chez le rat partiellement hépalectomisé.* — Nous avons cherché à déterminer si la présence du foie est indispensable pour que l'action de la cortisone se manifeste. On pratique l'hépalectomie subtotale chez 10 rats pesant environ 150 g, suivant la technique de Selye [28]. Trois jours plus tard, les animaux sont divisés en deux lots et

(2) Il faut injecter 0,3 mg du même antigène par voie intraveineuse pour tuer la souris normale.

sont tous inoculés par voie intrapéritonéale avec 0,2 mg d'antigène glucido-lipidique.

Les 5 témoins meurent en moins de huit heures.

Les animaux qui ont reçu 6 mg de cortisone une heure avant l'antigène meurent dans les délais suivants :

Un en vingt-quatre heures ; un en quarante-huit heures ; deux en trois jours ; le cinquième est sacrifié quinze jours plus tard.

Bien que la dose 100 p. 100 mortelle chez le rat, en moins de vingt-quatre heures, soit de 0,5 mg et que les témoins hépatectomisés aient succombé à 0,2 mg en quelques heures, il ne semble pas que la cortisone agisse au niveau du foie. L'animal étant devenu plus sensible à n'importe quelle substance toxique, la protection hormonale paraît d'autant plus significative.

B. RÔLE DE LA RATE. — La cortisone augmente le nombre des éosinophiles dans la rate [25], tout en diminuant son volume et en s'opposant à l'hypertrophie de cet organe chez l'animal infecté [26, 27]. Toutefois, la splénectomie n'augmente pas la sensibilité de l'animal à l'endotoxine et n'empêche pas la cortisone d'agir favorablement.

Ainsi, après ablation d'organes réticulo-endothéliaux, dont le rôle antitoxique a toujours été considéré comme majeur, la sensibilité de l'animal à l'endotoxine n'est pas augmentée d'une manière appréciable. (Rappelons qu'après surrénalectomie, le centième de la dose suffit pour tuer la souris). Par ailleurs, la cortisone manifeste pleinement son action après la splénectomie ou l'hépatectomie.

C. RÔLE DU THYMUS. — On connaît les rapports étroits qui existent entre le thymus et la surrénale. Le thymus est hypertrophié chez l'animal décapsulé ; la cortisone ainsi que le « stress » le font considérablement diminuer de volume [28, 29]. Ces constatations expérimentales sont venues étayer les anciennes observations cliniques au sujet de « l'état thymico-lymphatique ». On a expliqué l'action de la cortisone par la lyse des lymphocytes et la libération de globulines, à partir desquelles se feraient les anticorps [30]. Bien que cette opinion ait été révisée depuis, la question se posait de savoir si la cortisone conservait son action antitoxique chez l'animal thymectomisé.

Voici, à titre d'exemple, les détails de l'une de nos expériences. Des rats pesant 80 g sont anesthésiés à l'éther, thymectomisés et surrénalectomisés. Deux jours plus tard, la cortisone est administrée par voie sous-cutanée, une heure avant l'endotoxine.

Des rats témoins surrénalectomisés seulement reçoivent au même moment les mêmes doses d'antigène et de cortisone. Un deuxième lot de témoins surrénalectomisés ne reçoit que l'antigène. Les rats surrénalectomisés meurent en trois heures. Chez

les 4 rats surrénalectomisés traités avec 5 mg de cortisone, 1 meurt en cinq heures, 3 sont vivants le sixième jour. Tous les rats [4] thymectomysés et surrénalectomisés survivent. Ainsi l'action de la cortisone est maintenue chez l'animal privé de son thymus.

D. LA CORTISONE AGIT-ELLE AU NIVEAU DU TISSU SANGUIN? — Il a été observé *in vitro* que le pouvoir histaminopexique du sang et des tissus du rat disparaît après surrénalectomie et qu'il est restitué par des injections de cortisone [31, 32, 33]. Existe-t-il un phénomène analogue à l'égard de l'endotoxine? Reilly et ses collaborateurs [34] ont signalé que le sérum sanguin possède une propriété antiendotoxine. En effet, le sérum de souris neutralise *in vitro* l'endotoxine. Mais cette action ne semble pas diminuer après la surrénalectomie et les injections de cortisone ne la modifient pas sensiblement.

La toxicité chez la souris normale est un critère bien peu sensible et il ne nous a pas été possible d'utiliser l'animal surrénalectomisé, car chez ce dernier 0,5 cm³ de sang provoque la plupart du temps un choc mortel. De toute façon, cette neutralisation *in vitro* semble être un artefact. Il serait difficile d'expliquer autrement que 0,01 mg d'endotoxine injectée par voie intraveineuse tue la souris surrénalectomisée. De plus, l'antigène glucido-lipidique ne semble pas être détruit *in vivo*, même après un temps très long, comme le démontrent les expériences de parabiose.

Nous avons récemment signalé [35] que l'antigène glucido-lipidique injecté à un parabionte tue les deux animaux. Néanmoins, dans un grand nombre de cas, si l'on a administré de la cortisone au parabionte qui a reçu l'endotoxine, il peut survivre à son partenaire. Il semble donc que l'hormone agisse localement et qu'elle ne détoxifie pas l'antigène. De plus, dans les conditions de nos expériences, la cortisone ne passe pas d'un parabionte à l'autre.

Dans notre travail, nous avons mesuré la vitesse de passage du radio-sodium. Une autre technique nous a permis de vérifier si la communication est bien établie entre les deux parabiontes.

Nous avons inoculé du trypanosome (*Trypanosoma brucei*) à un parabionte et attendu que les parasites se soient également multipliés dans le sang des deux animaux. Nous avons alors injecté 3 cm³ de sérum humain à l'un des parabiontes. En quelques heures, le nombre des flagellés décroît, puis ils disparaissent totalement, chez les deux partenaires. Cette propriété trypanocide du sang humain signalée par Laveran est liée aux globulines : cette méthode permet donc de suivre le passage d'une grosse molécule [36].

CONCLUSIONS.

Tout apport exogène continu de cortisone produit un effet défavorable, aussi faut-il présumer que la cortico-surrénale remplit sa fonction en se déchargeant brutalement, plutôt que par une sécrétion soutenue.

Bien qu'il soit séduisant d'attribuer cet effet nocif à l'action diabétogène du composé E, des essais préliminaires faits avec l'insuline se sont révélés inefficaces. Il faut ajouter que, dans nos expériences, les animaux infectés et traités avec la cortisone avaient une augmentation marquée du glycogène hépatique, mais que cette augmentation ne s'accompagnait pas d'hyperglycémie.

Le mécanisme de l'action antitoxique de cette hormone demeure obscur. Cependant, il semble que la cortisone protège l'animal sans détruire l'antigène glucido-lipidique, puisque ce dernier passe d'un parabionte à l'autre en conservant sa toxicité. L'action hormonale doit s'exercer sans doute par un relais périphérique chez l'hôte dont elle augmente la résistance : elle ne semble pas se faire au niveau sanguin, ni par l'intermédiaire du thymus, de la rate ou du foie.

Pour Lurie « il est possible que la cortisone diminue la perméabilité de la membrane cellulaire... réduisant de la sorte les lésions qu'exercent les agents toxiques au niveau des cellules ». On trouvera, résumées par cet auteur, les nombreuses propriétés de cette hormone qui « agit dans les infections comme une arme à double tranchant » [37, 38].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. CHEDID, F. POYER et M. SAVIARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 713.
- [2] L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD. *Ces Annales*, 1952, **83**, 213.
- [3] F. BOYER et L. CHEDID. *Ces Annales*, 1953, **84**, 453.
- [4] M. TULIN, F. KERN et T. P. ALMY. *J. Amer. med. Assoc.*, 1952, **150**, 559.
- [5] C. A. GOOD, H. KRAMER et M. SOMOGYI. *J. biol. Chem.*, 1933, **100**, 485.
- [6] M. L. PABST, R. SHEPPARD et M. H. KUIZENGA. *Endocrinology*, 1947, **41**, 55.
- [7] M. A. SAYERS, G. SAYERS et L. A. WOODBURY. *Endocrinology*, 1948, **42**, 379.
- [8] R. COURRIER, M. BACLESSE et M. MAROIS. *J. Physiol.*, 1953, **45**, 327.
- [9] J. H. BALMAIN et R. F. GLASCOCK. *Nature*, 1952, **169**, 4298.
- [10] W. C. STADIE, N. HANGAARD et J. B. MARSH. *J. biol. Chem.*, 1952, **198**, 785.
- [11] S. ARTUNKAL et S. KAYAHAN. *J. Clin. Endocr.*, 1952, **42**, 1095.
- [12] R. C. DE BODO, M. W. SINKOFF et S. P. KIANG. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **80**, 350.

- [13] C. N. H. LONG, B. KATZIN et E. G. FRY. *Endocrinology*, 1940, **26**, 309.
- [14] A. LAZZAROW et J. BERMAN. *Anat. Rec.*, 1950, **106**, 215.
- [15] G. D. ABRAMS, B. L. BAKER, D. J. INGLE et C. H. LI. *Endocrinology*, 1953, **53**, 252.
- [16] P. ROCHE JR., M. M. CUMMINGS et P. C. HODGES. *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 603.
- [17] J. F. GRATTAN et H. JENSEN. *J. biol. Chem.*, 1940, **135**, 511.
- [18] D. GALE et S. S. ELBERG. *J. inf. Dis.*, 1952, **91**, 50.
- [19] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 553.
- [20] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *Rev. Immunol.*, 1936, **2**, 113.
- [21] A. M. DE ANDINO JR., J. L. RIVERO-FONTAN et K. E. PASCHKIS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 700.
- [22] O. HECHTER, M. M. SOLOMON, I. A. MACCHI, E. CASPI et M. FEINSTEIN. *J. clin. Endocr. Metab.*, 1952, **12**, 935.
- [23] R. B. BURTON, E. H. KEUTMANN et C. WATERHOUSE. *J. clin. Endocr. Metab.*, 1953, **13**, 48.
- [24] A. B. EISENSTEIN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **83**, 27.
- [25] D. M. SPAIN et W. THALHEIMER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **76**, 320.
- [26] G. M. FINDLAY et E. M. HOWARD. *Nature*, 1952, **169**, 547.
- [27] R. VARGUE. Communication personnelle.
- [28] H. SELYE. *Stress*. Acta Endocrinologica Inc., Montréal, 1950.
- [29] D. J. INGLE. *J. Clin. Endocr.*, 1950, **10**, 1312.
- [30] T. F. DOUGHERTY et A. WHITE. *Am. J. Anat.*, 1945, **77**, 81.
- [31] D. J. SMITH. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 534.
- [32] A. GOTH, R. M. ALLMAN, B. C. MERRITT et J. HOLLMAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 848.
- [33] G. LABORDE, J.-L. PARROT, D. A. URQUIA. *La Presse Médicale*, 1953, **61**, 1151.
- [34] J. REILLY, E. RIVALIER, A. COMPAGNON, H. C. PHAM, E. FRIEDMANN et H. DU BUIT. *Ann. Med.*, 1936, **39**, 120 et suiv.
- [35] L. CHEDID et F. BOYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1014.
- [36] A. LAVERAN et F. MESNIL. *Trypanosomes et Trypanosomiasés*. Paris, 1912, Masson, édit.
- [37] M. B. LURIE, P. ZAPPAZODI, A. M. DANNENBERG et E. C. LYNCH. *Trans. 47th Ann. Meeting Nat. Tuber. Ass.*, 1951.
- [38] M. B. LURIE, P. ZAPPAZODI, A. M. DANNENBERG et E. C. LYNCH. *Advances in Surgery and Medicine from the Graduate School of the University of Pennsylvania*, 1952.

TOXINE TÉTANIQUE ET FORMOL

par M. CHEYROUX (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

La transformation de bouillons toxiques en produits atoxiques mais conservant leurs propriétés antigéniques est obtenue aisément et de façon sûre par la méthode de G. Ramon, qui allie l'emploi judicieux du formol à celui de la température.

Cependant, le mécanisme de cette action conjuguée du formol et de la température sur les toxines n'est pas élucidé, malgré les nombreuses recherches auxquelles il a donné lieu, en particulier en ce qui concerne l'obtention de l'anatoxine diphtérique.

Dans certaines limites, l'augmentation de la quantité de formol, l'alcalinisation du pH, l'élévation de la température activent la transformation en anatoxine. Sur ces points, l'accord est général. Mais sur l'action de la formaldéhyde les opinions diffèrent : réaction directe par méthylénisation de groupements aminés appartenant aux molécules toxiques ?

— action catalytique favorisant une hydrolyse partielle ou des réactions de condensation soit dans la molécule toxique elle-même, soit dans les protéines qui l'entourent ?

— action secondaire sur la molécule toxique du formol combiné aux protéines du bouillon ?

Aucune de ces hypothèses n'a encore été définitivement confirmée. Quoi qu'il en soit, dans les expériences qui suivent, nous nous sommes efforcé d'étudier, pour la transformation de la toxine tétanique en anatoxine, les divers rapports existant entre, d'une part, la quantité de formol fixée par le bouillon toxique (1) et, d'autre part, la détoxification de ce bouillon et la variation de sa valeur floculante, en faisant varier pour cela la quantité de formol ajoutée à la toxine, et le pH de la toxine formolée.

I. — DÉTOXIFICATION ET FIXATION DE FORMALDÉHYDE DANS LES CONDITIONS NORMALES.

Le traitement de la toxine tétanique par étuvage à 40° après addition de 5 cm³ p. 1 000 d'une solution à 40 p. 100 d'aldéhyde

(*) Manuscrit reçu le 30 octobre 1953.

(1) Dans toute cette expérimentation nous avons utilisé la méthode de titrage de l'aldéhyde formique au dimédon exposée par Velluz, *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **411**, 289.

formique donne en un mois un produit atoxique, ayant conservé la majeure partie de son antigénicité : l'anatoxine tétanique. Mais la chute du pouvoir toxique se fait de telle sorte qu'en moins de trois semaines la toxine traitée est en fait déjà inoffensive.

Pour préciser la vitesse de disparition de la toxicité, nous avons traité selon la technique habituelle des lots de toxine tétanique en les testant chaque jour durant la première semaine d'étuvage, à des intervalles de plusieurs jours par la suite.

On obtient alors pour chaque lot une courbe semblable à celle de la figure 1, qui correspond à l'une de nos expériences.

En ordonnée, sont portés les logarithmes du nombre de doses

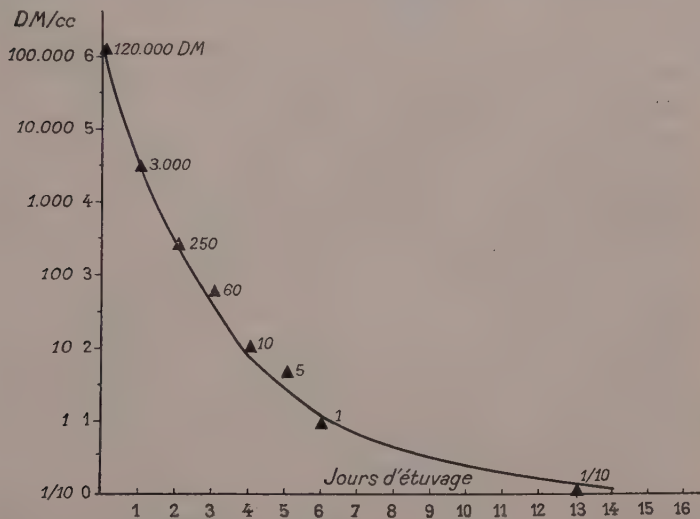


FIG. 1.

mortelles pour le cobaye, par centimètre cube, nombre multiplié par 10 pour pouvoir inscrire sur la courbe le 1/10 de DM (correspondant ainsi au point zéro). En abscisse est inscrit le nombre de jours d'étuvage correspondant.

Cette courbe correspond assez exactement à celle obtenue avec une formule de la forme :

$$\text{Log } \Theta = \text{Log } T \times a^n$$

Θ étant la toxicité au jour n .

T étant la toxicité initiale.

a un facteur spécifique.

n le nombre de jours écoulé depuis la formolisation et l'étuvage.

Dans l'expérience faisant l'objet de la figure $a = 0,75$; et c'est

un facteur du même ordre que nous avons retrouvé dans toutes les expériences similaires.

Lorsque, dans les mêmes conditions d'expérimentation, on suit la fixation du formol, on obtient la courbe 2.

Cette courbe ne s'interprète par aucune formule simple opposable à celle de la chute de toxicité, car malgré son allure exponentielle durant les premiers jours d'étuvage, sa pente diminue très vite. La fixation se ralentit rapidement et tend vers une stabilisation. A la fin de l'étuvage, le bouillon toxique formolé s'oriente donc vers un état d'équilibre comportant un taux de

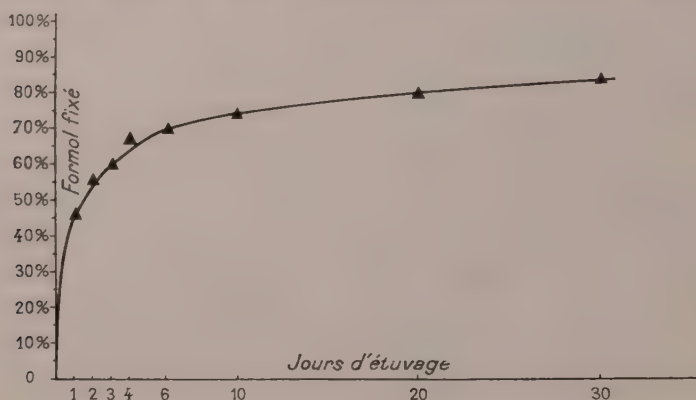


Fig. 2.

formol libre de l'ordre de 15 p. 100 de la formaldéhyde ajoutée.

Comme nous le verrons par la suite, cet équilibre se conserve pratiquement pendant le stockage en chambre froide qui succède à l'étuvage, mais est perturbé si les anatoxines sont conservées à une température plus élevée (laboratoire ou étuve).

II. — DÉTOXIFICATION ET FIXATION DE FORMOL QUAND LA QUANTITÉ DE FORMALDÉHYDE VARIE.

Pour étudier l'influence de la quantité de formol ajoutée à la toxine à la fois sur la quantité de formaldéhyde fixée, et la détoxification de la toxine, dans des conditions d'étuvage (température et durée) fixes, nous avons pris des séries de flacons, chaque série appartenant à un même lot de toxine tétanique.

Dans ces séries, chaque flacon a reçu une quantité de formol différente, et croissant de 1,040 g pour 1 000 cm³, de formaldéhyde jusqu'à 6,050 g.

A la fin de l'étuvage d'un mois à 40°, le formol libre a été dosé, ce qui a donné par soustraction le formol fixé ; et nous avons testé la toxicité du produit.

Les résultats concernant la fixation sont reproduits pour l'une de nos expériences dans la figure 3.

Les quantités de formaldéhyde ajoutées sont traduites par la bissectrice des axes des X et Y.

Les quantités de formaldéhyde fixées sont représentées par la droite de formule $Y = aX + b$, dont l'équation est ici :

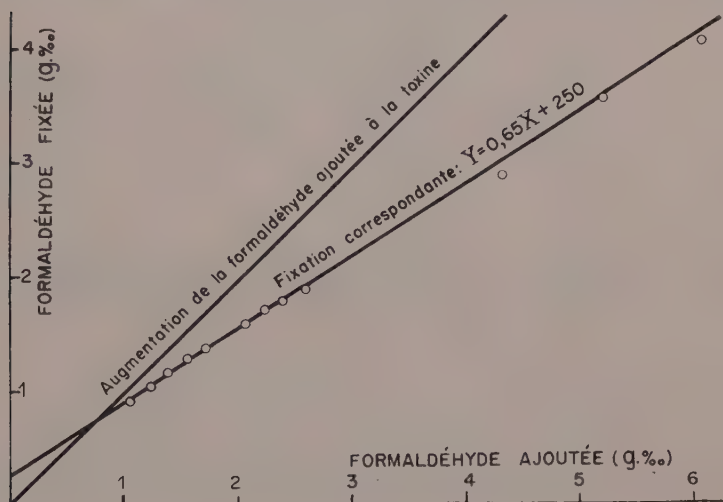


FIG. 3.

$Y = 0,65 X + 250$ (Y et X étant exprimés en milligrammes de formaldéhyde).

Suivant les lots de toxine utilisés, les facteurs a et b varient légèrement, mais les résultats sont toujours comparables.

En ce qui concerne la détoxification, les résultats concernant la même expérience sont inscrits dans le tableau I.

De cette expérimentation, on peut conclure que, pour une toxine donnée, placée dans des conditions d'étuvage (température et durée) données :

1° Au-dessous d'un certain taux de formol la détoxification est incomplète, et ceci d'autant plus que le taux de formol est plus faible.

2° Alors même que la détoxification n'est plus assurée, il reste toujours une certaine quantité de formol libre (dans la limite des taux utilisés).

3° Les quantités de formol fixé varient dans le même sens que

TABLEAU I.

Flacons	Formol ajouté en HCHO p. 1000	HCHO fixé p. 1000	Toxicité des échantillons pour le cobaye de 350 g.
1	6,050 g	4,210 g	Rien -
2	5,180 g	3,420 g	" -
3	4,320 g	2,920 g	" -
4	3,450 g	2,540 g	" -
5	2,590 g	1,910 g	" -
6	2,420 g	1,820 g	" -
7	2,240 g	1,710 g	" -
8	2,070 g	1,600 g	" -
9	1,900 g	1,430 g	" -
10	1,730 g	1,360 g	" -
11	1,550 g	1,290 g	" -
12	1,380 g	1,150 g	" -
13	1,210 g	1,020 g	Paralysie locale 15e jour-survie
14	1,040 g	0,900 g	Tétanos généralisé 5e j. - M. le 8e j.

celles de formol ajouté, mais non parallèlement. Plus la quantité ajoutée est faible, plus fort est le pourcentage de fixation.

Notons cependant que, pour une même quantité de formol ajouté, la fixation varie légèrement suivant les lots de toxine, et que suivant les lots également, la toxicité apparaît à des taux légèrement différents de formol ajouté (2).

III. — DÉTOXIFICATION ET FIXATION DU FORMOL QUAND LE pH VARIE.

L'importance du pH a été longuement étudiée dans la préparation de l'anatoxine diphtérique, et nous nous sommes attaché à la mettre en évidence en ce qui concerne l'anatoxine tétanique.

Rappelons tout d'abord que la formolisation d'une toxine quelconque amène toujours une acidification immédiate, variable suivant la nature de la toxine (diphtérique, tétanique, etc.) et suivant les lots de toxine de même nature.

Cette acidification brutale n'est pas stable, en règle générale, le pH remonte au cours de l'étuvage, compensation due vraisemblablement au pouvoir tampon des bouillons.

(2) Les conclusions de ce chapitre sont valables pour toutes les autres toxines que nous avons étudiées : toxines diphtérique, botulique A, botulique B.

De toutes façons, ces modifications « naturelles » du pH n'influencent en rien le processus de détoxification de la toxine.

Que se passe-t-il, au contraire, si intentionnellement on modifie le pH de la toxine immédiatement après formolisation (c'est-à-dire, compte tenu de l'acidification qu'elle provoque)?

Par addition d'acide chlorhydrique, ou de soude, à 9 échantillons d'une même toxine tétanique que l'on vient de formoler, on prépare une gamme de flacons de pH croissant qui sont ensuite étuvés à 40°. Un dixième flacon de toxine formolée sert de témoin.

Compte tenu des modifications déjà notées pour les anatoxines normales, on peut dire que le pH de chacun de ces échantillons reste stable durant l'étuvage. La gamme de pH au bout d'un mois est pratiquement la même que celle du début.

Les résultats obtenus au point de vue de la fixation de formaldéhyde d'une part, de la détoxification d'autre part, sont les suivants :

A. FIXATION DE FORMALDÉHYDE. — Le tableau II donne les résultats obtenus lors d'une de nos expériences après quatre semaines d'étuvage à 40°.

TABLEAU II.

: pH de l'échantillon :	: Pourcentage d'HCHO fixé :
: - :	: après 4 semaines à 40° :
: 5,67 :	: 72,2 % :
: 6,05 :	: 74,9 % :
: 6,25 :	: 76,8 % :
: 6,40 :	: 81 % :
: 6,68 :	: 86,3 % :
: 6,90 :	: 87,8 % :
: 7,10 :	: 90 % :
: 7,31 :	: 90,8 % :
: 7,60 :	: 92,4 % :
: Témoin 6,75 :	: 83,5 % :

L'influence du pH sur la fixation de formaldéhyde est évidente.

Plus le pH est élevé, plus la fixation est importante. Pour une élévation de pH de 2 unités environ, la fixation est majorée de

20 p. 100, le témoin restant conforme à ce que nous avons vu au chapitre des anatoxines normales.

B. DÉTOXIFICATION — Le tableau III donne les résultats correspondant à l'expérience précédente. Nous y présentons le résultat des tests de toxicité effectués hebdomadairement, l'expérience ayant été prolongée d'une semaine pour essayer de parfaire la détoxification des échantillons demeurés toxiques au bout d'un mois d'étuvage.

TABLEAU III.

pH des échantillons	Toxicité après formolisation et étuvage de				
	6 j.	15 j.	21 j.	28 j.	35 j.
5,67	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	I/100 DM	?
6,05	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	I/100 DM	-I/100
6,25	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	I/100 DM	-I/100
6,40	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	I/100 DM	-I/100
6,68	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	-I/100	0
6,90	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	?	0
7,10	I DM/cm ³	I/7 DM	I/25 DM	0	0
7,31	I DM/cm ³	I/7 DM	-I/100 DM	0	0
7,60	I DM/cm ³	I/10 DM	0	0	0
Témoin 6,75	I DM/cm ³	I/7 DM	I/30 DM	?(I)	0

Au-dessous de 1/10 de DM par centimètre cube, nous avons estimé la toxicité en utilisant une échelle arbitraire d'interprétation, mais correspondant à l'évolution de l'intoxication tétanique habituellement observée sur des cobayes de 350 g. Cette échelle est la suivante :

Mort du cobaye de 350 g en 4 jours : la quantité injectée contient 1 DM.

Mort du cobaye de 350 g en 6 jours : la quantité injectée contient 8/10 DM.

Mort du cobaye de 350 g en 8 jours : la quantité injectée contient 6/10 DM.

Mort du cobaye de 350 g en 10 jours : la quantité injectée contient 4/10 DM.

Paralysie sans mort, ou mort au delà du 10^e jour : la quantité injectée contient 1/10 DM.

La relation entre la détoxification et l'élévation des pH ressort nettement de ces résultats. Un pH élevé qui favorise la fixation du formol active corrélativement la détoxification. Un fait discordant est cependant à noter. Dans toutes nos expériences, le flacon au pH le plus bas (toujours aux environs de pH 5,50-5,60) a paru se détoxifier légèrement plus tôt que ses suivants immédiats. Ce phénomène paraît en corrélation, non avec sa fixation de formol qui fut toujours la moins élevée, mais avec la variation de sa valeur flocculante que nous allons voir dans le chapitre suivant.

IV. — VARIATIONS DE LA VALEUR FLOCLANTE.
EN FONCTION DES VARIATIONS DU pH.

La valeur floclante d'une toxine tétanique est modifiée par l'action du formol et de l'étuvage : l'anatoxine a une valeur floclante plus faible que la toxine. Quelle est l'influence du pH sur cette perte d'unités ?

Le pourcentage que représente cette perte par rapport à la valeur de la toxine oscille entre 15 et 25 p. 100 et semble sur un grand nombre de lots être plus élevé pour les toxines fortes que pour les plus faibles, comme en témoigne le tableau IV.

TABLEAU IV.

Valeur floclante des toxines	Nombre d'échantillons	Pourcentage de perte des anatoxines
12 à 20 Lf	6	12 %
21 à 25 Lf	14	18 %
26 à 30 Lf	19	14 %
31 à 35 Lf	24	16 %
36 à 40 Lf	31	17 %
41 à 45 Lf	20	17 %
46 à 50 Lf	12	21 %
51 à 55 Lf	9	25 %
56 à 62 Lf	11	24 %
Moy : 12 à 62 Lf	146	18 %

Nos expériences ont porté sur les divers échantillons constituant les gammes à pH croissant, déjà suivies au point de vue détoxification et fixation de formol.

Pour toutes, les résultats ont été similaires. Et compte tenu des différences dues aux lots de toxines et particulièrement traduites par les écarts des titres initiaux, les courbes obtenues ont une similitude frappante.

La figure 4 donne, toujours en ce qui concerne la même toxine que dans les expériences précédentes, les valeurs en unités floclantes successivement enregistrées après une, quatre et cinq semaines d'étuvage. Pour éviter la surcharge de la figure, les courbes des deuxième et troisième semaines, d'allure intermédiaire entre celles des première et quatrième semaines, ne sont pas reproduites.

Dès la fin de la première semaine, l'influence du pH est frappante. Il apparaît que, plus le pH est élevé, plus la valeur floclante diminue. La même constatation est valable au cours des trois semaines suivantes. Pour tous les échantillons, la perte en unités s'accroît, mais reste moins importante dans la zone acide que dans la zone alcaline. Tout se passe comme si l'acidité du pH protégeait la toxine contre l'action du formol et de la chaleur, ce qui est conforme aux résultats obtenus par titrage

du formol, la fixation de celui-ci, nous l'avons vu, étant proportionnelle au pH.

Mais à la fin de la quatrième semaine apparaît un fait plus prononcé encore à la fin de la cinquième, c'est la dissociation du comportement des deux flacons les plus acides, dont la valeur floculante continue à baisser, alors que pour le troisième flacon la perte est stabilisée en quatre semaines.

Ce fléchissement de la valeur floculante au pH le plus bas est

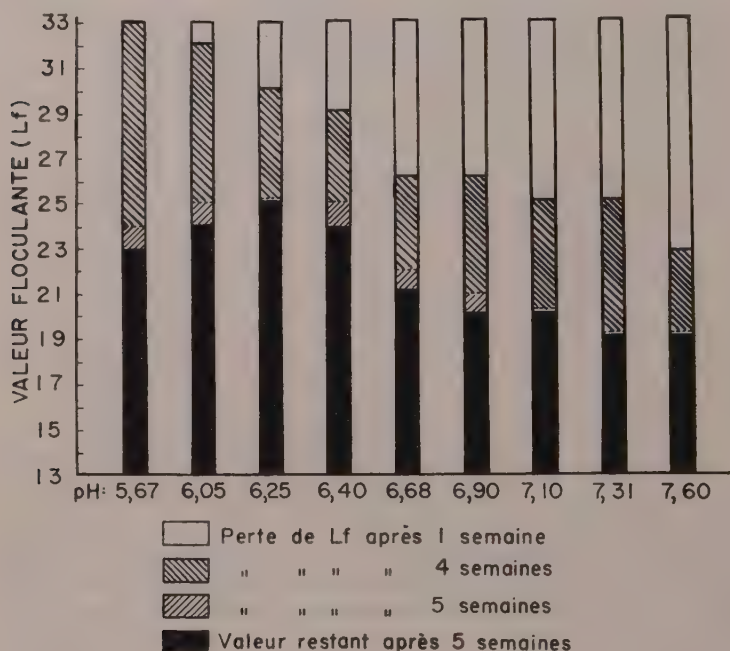


FIG. 4.

à rapprocher de la légère avance dans la détoxification qui marque le même flacon et que nous avons notée au chapitre précédent. Ce fait qui mérite d'être étudié plus en détail ne donne lieu qu'à des hypothèses.

INFLUENCE DU pH SUR LE TEMPS DE FLOCCULATION. — L'influence n'est pas moins nette sur le temps de floculation, qui se montre en effet proportionnel au pH : plus celui-ci est élevé, plus longue à se produire est la floculation, et ceci à toutes les périodes de l'élevage.

D'autre part, pour chaque échantillon, le temps de floculation augmente, notion déjà bien connue, avec la durée de l'élevage.

Cette augmentation est cependant moins marquée dans la zone acide que dans la zone alcaline.

V. — EXPÉRIENCES COMPLÉMENTAIRES.

Pour compléter cette étude sur la transformation des toxines tétaniques en anatoxines et les rapports entre détoxification et fixation de formol, nous nous sommes livré à quelques expériences complémentaires.

Elles ont porté sur les points suivants :

1° Une toxine tétanique traitée par une quantité insuffisante de formol et conservant de ce fait un reste de toxicité après un mois d'étuvage à 40° se détoxifie-t-elle entièrement si, à ce moment, on fait une nouvelle addition de formol, suivie d'un nouvel étuvage ?

2° Que devient une toxine formolée demeurée toxique dans les mêmes conditions, lorsque, sans addition de formol, elle n'est soumise qu'à un simple vieillissement, soit à l'étuve, soit à la température du laboratoire, soit en chambre froide ?

3° Pour des anatoxines normales, quel est le devenir du formol libre résiduel après un vieillissement de plusieurs années soit à l'étuve, soit à la température du laboratoire, soit en chambre froide ?

I. ACTION D'UNE NOUVELLE ADDITION DE FORMOL SUR DES TOXINES TÉTANIQUES TRAITÉES, MAIS NON ENTIÈREMENT DÉTOXIFIÉES. — Utilisant les conclusions des expériences présentées au chapitre II, nous avons préparé une gamme de cinq flacons de toxine tétanique du même lot, qui ont été additionnés de quantités croissantes de formol. Après un mois d'étuvage à 40°, les résultats de fixation de formol étaient absolument conformes aux prévisions, et le test de toxicité confirmait nos expériences précédentes : les trois flacons ayant reçu les quantités de formol les plus basses conservaient de la toxicité. Le tableau V résume ces résultats à la sortie de l'étuve.

Le flacon I reçoit alors une addition supplémentaire de formol (équivalente à 0,435 g HCHO) ; on le replace à l'étuve.

Le flacon II est remplacé à l'étuve sans addition supplémentaire de formol.

Le flacon III est laissé à la température du laboratoire.

Les flacons IV et V sont placés en chambre froide (+4°).

Après quinze jours, les flacons sont repris et testés à nouveau. Les résultats sont inscrits au tableau VI.

Cette expérience prouvait qu'une addition supplémentaire de formol avec prolongation de l'étuvage faisait disparaître un reste de toxicité.

TABLEAU V.

Flacons	Formol ajouté p.1000	Formol fixé p.1000	Toxicité
I	1,510	1,317	1/6 DM/cm ³
II	1,730	1,380	1/12 DM/cm ³
III	1,945	1,530	1/50 DM/cm ³
IV	2,160	1,685	—
V	2,375	1,840	—

TABLEAU VI.

Flacons	Formol ajouté p.1000	Formol fixé p.1000	Toxicité
I	1,945	1,641	—
II	1,730	1,543	—
III	1,945	1,604	—
IV	2,160	1,757	—
V	2,375	1,873	—

Mais elle prouvait également que le réétuvage seul — et même le simple vieillissement à la température du laboratoire — suffisaient à détruire en quinze jours des restes de toxicité respectivement égaux à 1/12 et 1/50 de DM/cm³.

C'est pourquoi nous avons entrepris une nouvelle expérience visant à établir le rôle du simple vieillissement d'une toxine partiellement détoxifiée et conservée à différentes températures.

II. ACTION DU VIEILLISSEMENT A DIVERSES TEMPÉRATURES SUR DES TOXINES TÉTANIQUES TRAITÉES, MAIS NON ENTIÈREMENT DÉTOXIFIÉES. — Par réduction de la quantité de formol ajoutée, on prépare quatre flacons de toxine tétanique formolée conservant après un mois d'étuvage à 40° un reste de toxicité d'environ 1/50 DM/cm³.

Les flacons 1 et 2 sont alors remis à l'étuve ; le flacon 3 est laissé à la température du laboratoire ; le quatrième est placé en chambre froide (+4°).

Ces flacons sont ensuite suivis régulièrement par dosage de formol, test de toxicité et pouvoir floculant.

Les résultats sont résumés dans le tableau VII.

TABLEAU VII.

	Départ		après		2 Semaines		3 Semaines		après 9 Semaines		
Flacons :	expériences	I	Semaine								
	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-	HCHO fixéToxi-		Lf
	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité	p. 1000 scité		
1	I, 445	I/50	I, 462	-I/50	I, 561	0	I, 593	0	I, 653	0	36 : 4h30
(étuvé)											
2	I, 479	I/50	I, 520	0	I, 592	0	I, 622	0	I, 645	0	36 : 4h30
(étuvé)											
3	I, 479	I/50	I, 489	?	I, 520	0	I, 520	0	I, 557	0	36 : 3h5
(T ^o lab)											
4	I, 468	I/50	I, 468	I/50	I, 468	I/50	I, 520	-I/50	I, 540	-I/50	37 : 3h
(+ 4°)											

On peut conclure de cette expérience que :

- 1° Un simple réétuvage suffit pour parfaire la détoxification ;
- 2° La fixation de formol se poursuit lentement en chambre froide, mais elle est favorisée par l'élévation de température ;
- 3° L'élévation de température, qui accroît la fixation du formol, influe parallèlement sur les modifications du bouillon toxique qui se traduit par la diminution plus importante du pouvoir floculant, et l'allongement du temps de floculation.

III. FORMOL LIBRE RÉSIDUEL DANS LES ANATOXINES TÉTANIQUES APRÈS VIEILLISSEMENT DE PLUSIEURS ANNÉES. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — Ces dosages de formol ont été exécutés sur des lots d'ampoules d'anatoxines tétaniques datant d'au moins trois ans. Dans chaque lot quelques ampoules avaient été conservées en chambre froide, d'autres à la température du laboratoire, d'autres enfin, à l'étuve à 40°.

Les résultats ont été les suivants :

Conservation en chambre froide : fixation moyenne de formol.	83 p. 100
Conservation à la température du laboratoire : fixation moyenne de formol.	91 —
Conservation à l'étuve 40° : fixation moyenne de formol.	99 —

On peut donc conclure que, dans les conditions de stockage normales, même après un vieillissement de plusieurs années, les anatoxines tétaniques conservent un taux de formol libre résiduel d'environ 10 p. 100 du formol ajouté.

RÉSUMÉ.

Nous avons réalisé diverses expériences pour étudier les rapports entre la fixation de formaldéhyde par les bouillons tétaniques toxiques et leur détoxification. Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

1° La détoxification d'une toxine tétanique formolée et étuvée est très rapide et suit une courbe d'allure exponentielle. La fixa-

tion corrélative d'aldéhyde formique, très rapide les premiers jours, tend ensuite à se stabiliser, laissant à la fin de l'étuvage un taux résiduel de formol libre de l'ordre de 15 p. 100.

2° Lorsque la quantité de formol ajoutée est trop faible, la détoxification est incomplète. Malgré cela, aux taux par nous utilisés, il demeure toujours une certaine quantité de formol libre. Pour un même lot de toxine, la quantité de formaldéhyde ajoutée et la quantité fixée sont liées selon une formule simple.

3° Lorsque le pH d'une toxine formolée et étuvée est artificiellement augmenté, la fixation de formol est plus rapide et plus importante. Les modifications consécutives subies par le bouillon toxique se traduisent :

Par une détoxification plus rapide ;

Par une diminution plus importante de la valeur flocculante ;

Par un allongement plus important du temps de floculation ;

4° Une toxine tétanique étuvée, mais insuffisamment formolée perd son reste de toxicité par prolongation de l'étuvage, avec ou sans addition supplémentaire de formol, sans modification importante de sa valeur flocculante.

5° Dans les conditions ordinaires de stockage, les anatoxines tétaniques conservent après trois ans de vieillissement un taux de formol libre résiduel d'environ 10 p. 100 de la formaldéhyde primitivement ajoutée.

BIBLIOGRAPHIE

- P. DESCOMBEY. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 239.
 GLENNY, HOPKINS et POPE. *J. Path. Bact.*, 1924, **27**, 261.
 HENSEVAL et NELIS. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 902.
 G. RAMON. *Ces Annales*, 1925, **39**, 1.
 P. NELIS. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 142.
 G. RAMON et P. DESCOMBEY. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 434.
 A. LEULIER, P. SÉDALLIAN et J. GAUMONT. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 1543.
 A. LEULIER, P. SÉDALLIAN et J. GAUMONT. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1746.
 G. RAMON. *Ces Annales*, 1928, **42**, 959.
 LEULIER, SÉDALLIAN et CLAVEL. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 679.
 L. VELLUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 745.
 L. VELLUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 819.
 W. E. BURNEY. *J. Immunol.*, 1931, **20**, 47.
 H. F. HOLDEN et M. FREEMAN. *Austral. J. exp. Biol.*, 1931, **8**, 189.
 L. VELLUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 289.
 S. SCHMIDT et J. FJORD NIELSEN. *Soc. Dan. Biol.*, 5 décembre 1932.
 S. SCHMIDT. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1933, **78**, 27.
 S. SCHMIDT. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1933, **78**, 323.
 S. SCHMIDT. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1933, **79**, 339.
 E. M. FOLLENSBY et S. B. HOOKER. *J. Immunol.*, 1936, **31**, 141.
 J. BARATTE. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 494.

- H. GOLDIE. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 974.
H. GOLDIE. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 977.
L. VELLUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 34.
R. PONS. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 209.
H. GOLDIE et G. SANDOR. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 454.
J. LOISELEUR. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 435.
J. LOISELEUR. *Ces Annales*, 1942, **68**, 439.
E. NEUZIL et R. PAUTRIZEL. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 186 et 188.
A. LEULIER, G. NOUVEL et J. BEDENE. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 427
et 429.
R. PAUTRIZEL, A. BEZIAN et E. NEUZIL. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1191.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.

Séance du 7 Janvier 1954.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

COMMUNICATIONS

SUR LA TENEUR EN MANGANÈSE DES PHANÉROGAMES

par GABRIEL BERTRAND et LAZARE SILBERSTEIN.

(Institut Pasteur.)

A la suite de la découverte par Scheele en 1774, découverte étonnante pour l'époque, de très petites quantités de manganèse dans les cendres du cumin sauvage et dans celles du bois, plusieurs chimistes ont signalé la présence de ce métal dans certaines substances ou tissus d'origine vivante [1]. Plusieurs physiologistes ont même tenté des expériences pour savoir si cet élément est nécessaire ou seulement utile soit aux plantes, soit aux animaux. Aucun résultat n'avait encore pu, à la fin du siècle dernier, apporter une certitude quelconque sur ces questions.

La connaissance de la laccase et du rôle joué par le manganèse dans les phénomènes oxydasiques a donné un nouvel essor aux recherches biochimiques et suscité, notamment, la détermination quantitative du manganèse dans un grand nombre de matériaux d'origine végétale.

Mais, comme on ne tarde pas à s'en apercevoir quand on scrute les résultats publiés, les analyses n'ont guère porté que sur des parties de plantes [2]. Or il est connu aujourd'hui que la composition chimique élémentaire varie beaucoup quantitativement d'un organe à l'autre d'une même plante [3] et qu'elle subit, en outre, des modifications importantes avec l'âge [4]. Il n'est donc, pour ainsi dire, pas possible de se servir des analyses publiées jusqu'ici pour se faire une idée un peu précise des besoins d'une espèce végétale donnée en manganèse et, à plus forte raison, de comparer à ce point de vue plusieurs espèces.

L'utilité de combler cette lacune nous a paru d'autant plus grande qu'il y avait lieu aussi de rechercher si les relations récemment mises

en évidence entre certains groupes naturels de plantes et leurs teneurs soit en bore, soit en rubidium [5], s'étendaient à d'autres éléments.

Nos analyses ont porté, pour chaque plante, sur la partie aérienne entière, récoltée en bon état de développement et au moment de la floraison (c'est-à-dire à l'âge physiologique qui semble le plus convenable).

Pour commencer, nous avons limité notre étude aux Phanérogames, dont nous avons analysé 160 espèces. Les échantillons de ces plantes provenaient, en grande partie, des récoltes faites au cours de ces dernières années et avaient servi à des recherches sur le rubidium, un certain nombre aussi aux recherches sur le bore.

La méthode d'analyse employée a été celle décrite en détail par l'un de nous en 1911, à cela près que nous avons utilisé un électro-colorimètre pour la mesure finale [6].

Il est à peine besoin de signaler que le manganèse a été retrouvé dans toutes les plantes. La connaissance qualitative de la présence générale de cet oligoélément dans la matière vivante trouve seulement dans nos résultats, par leur grand nombre, une importante confirmation.

Examinés au point de vue quantitatif, ces résultats montrent en premier lieu que les teneurs en manganèse, rapportées au kilogramme de plante sèche, varient d'environ 15 mg (*Galium Mollugo*, Origan, *Allium carinatum*, *Iris germanica*) à plus de 0,5 g et même de 1 g.

Si on range ensuite ces teneurs par ordre croissant, on reconnaît que les plus faibles jusqu'à 20 mg sont peu fréquentes (6,9 p. 100) et que celles dépassant 200 mg ne le sont pas davantage (6,9 p. 100).

Ce sont les espèces contenant entre 20 et 60 mg de métal par kilogramme sec qui existent dans la plus grande proportion (51,9 p. 100). Celles dont la teneur s'élève de 60 à 100 mg ne sont déjà plus que 15,6 p. 100.

Nous n'avons pas manqué de comparer les teneurs moyennes qui reviennent à certains groupes déterminés de plantes pour voir s'il se manifeste dans la répartition quantitative du manganèse, parmi ces groupes, des relations analogues à celles rencontrées avec le bore et le rubidium : les Graminées et les Labiées sont encore apparues parmi les plantes dont les besoins en oligoéléments sont les moins élevés. Mais nous attendrons d'avoir augmenté le nombre d'analyses dont nous disposons pour formuler des conclusions plus étendues.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Gabriel BERTRAND. *Le manganèse dans la nature* (Conférences de Chimie du Laboratoire de H. Moissan). *Rev. gén. Chimie*, 1905, **8**, 68.
- [2] Voir notamment : JADIN et ASTRUC. *C. R. Acad. Sci.*, 1913, **155**, 406. — Gabriel BERTRAND et M. ROSENBLATT, *Ibid.*, 1921, **173**, 333. — D. H. WESTER. *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **118**, 158 et *Ber. deut. Pharmaz. Gesellsch.*, 1922, **32**, 16.
- [3] Pour le manganèse, par exemple, voir Gabriel BERTRAND et M. ROSENBLATT. *C. R. Acad. Sci.*, 1921, **173**, 1118.
- [4] Gabriel BERTRAND et M. ROSENBLATT. *C. R. Acad. Sci.*, 1922, **174**, 491.
- [5] Gabriel BERTRAND et Didier BERTRAND. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 343.
- [6] Gabriel BERTRAND. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, 1911, **9**, 361.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LA TENEUR EN MANGANÈSE DES PHANÉROGAMES

par GABRIEL BERTRAND et LAZARE SILBERSTEIN.

(Institut Pasteur.)

Nous avons donné les raisons qui nous ont conduits à entreprendre le dosage du manganèse dans un nombre important de plantes entières. Les premiers résultats que nous avons obtenus en opérant sur 160 espèces de Phanérogames [4] ont justifié ces raisons et nous ont engagés à poursuivre l'enquête commencée. Actuellement, nous avons pu récolter et préparer dans de bonnes conditions, puis analyser 420 échantillons provenant de 389 espèces de Phanérogames.

La différence entre le nombre des échantillons et celui des espèces tient, soit à ce que certaines plantes étant dioïques leur analyse a porté séparément sur des individus mâles et des individus femelles et que l'on a pris pour l'espèce la moyenne des résultats obtenus (cas du Compagnon blanc, de la Bryone, de la Mercuriale vivace et de la Grande Ortie), ou bien à ce que la partie aérienne de telle ou telle plante biannuelle étant formée des tiges de l'année portées par des branches de l'année précédente, on a calculé la moyenne proportionnelle des chiffres résultant des unes et des autres (cas de *Satureia montana* et de *Epilobum rosmarinifolium*). Ou bien encore, et ce cas est le plus fréquent, il s'agit de la moyenne des teneurs trouvées en analysant deux échantillons d'une même espèce différant par l'année ou le lieu de la récolte.

Cet ensemble de recherches nous permet de considérer comme très voisines de la vérité, du moins pour la France et les régions limitrophes de l'Angleterre, de l'Italie et de la Suisse, les observations suivantes :

Tout d'abord, le manganèse est dosable dans toutes les espèces, par la méthode que nous avons utilisée, en opérant sur 1 g au plus de plante sèche.

Les teneurs en métal trouvées varient largement d'une espèce à l'autre : d'environ 1 cg par kilogramme sec (Orobanche, Aconit tue-loup, Herbe au chat, etc.) à plus de 500 mg et même de 1 g.

Si l'on inscrit ces teneurs par ordre de grandeur croissante, on peut reconnaître que les plus faibles, jusqu'à 20 mg, sont peu fréquentes (env. 8 p. 100) et que celles dépassant 200 mg le sont encore moins (env. 6,5 p. 100).

Ce sont les espèces contenant entre 20 et 50 mg de métal par kilogramme sec qui existent dans la plus grande proportion (près de la moitié). Celles dont la teneur s'élève de 50 à 100 mg ne sont déjà plus que de 20 p. 100. Les teneurs en manganèse que l'on rencontre le plus souvent sont donc voisines de 20 (± 5) mg par kilogramme de matière sèche.

Si l'on considère à présent la teneur en manganèse non plus simple-

ment par rapport aux espèces, quel que soit l'ordre dans lequel on les rencontre au fur et à mesure des récoltes ou des analyses, mais en faisant intervenir la place que ces espèces occupent dans une classification naturelle, basée sur la forme extérieure et l'anatomie des organes, on observe l'existence d'une certaine relation entre la teneur moyenne en métal et les groupes plus ou moins importants auxquels les plantes appartiennent.

Nous avons trouvé pour les familles particulièrement nombreuses ou intéressantes par certaines de leurs espèces, les chiffres exposés dans le tableau ci-joint.

	NOMBRE D'ESPÈCES analysées	MANGANÈSE par espèce mg/kg de matière sèche
DICOTYLÉDONES		
Renonculacées	23	103,4
Crucifères	26	43,7
Caryophyllées	21	110,4
Légumineuses	25	76,6
Rosacées	13	130,6
Ombellifères	14	64,2
Composées	34	62,3
Boraginées	10	67,8
Solanées	11	65,0
Scrofulariées	12	101,5
Labiées	26	64,3
Salsolacées	11	30,2
Polygonées	11	64,9
Autres familles dicotylédones	81	109,2
MONOCOTYLÉDONES		
Graminées	35	77,5
Autres familles de monocotylédones.	36	126,5

Il résulte de ce tableau que des familles entières de plantes, spécialement les Crucifères et les Salsolacées parmi les Dicotylédones, les Graminées parmi les Monocotylédones, sont formées d'espèces contenant d'ordinaire des proportions de manganèse très inférieures à la moyenne de celles que l'on rencontre dans les embranchements auxquels elles appartiennent (1).

BIBLIOGRAPHIE

[1] Gabriel BERTRAND et L. SILBERSTEIN. Voir la Note précédente.

(1) Cette note est extraite d'un Mémoire qui paraîtra prochainement et dans lequel on trouvera d'autres détails et le tableau complet des résultats analytiques.

DE QUELQUES VOIES D'INOCULATION DU VIRUS DU MYXOME INFECTIEUX

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

On considère que la transmission expérimentale du myxome de Sanarelli est facilement obtenue par toutes les voies habituellement employées et cela est exact en thèse générale. Mais il ne faudrait pas en déduire que l'infection puisse être réalisée inmanquablement par toutes ces voies et, particulièrement, que les modes d'infection les plus courants soient également sûrs. Nous en examinerons quelques-uns ici.

INOCULATION SOUS-CUTANÉE. — Elle offre toutes garanties ; lorsqu'une injection hypodermique de matériel expérimental reste inopérante on peut tenir pour établi que le dit matériel ne contenait pas de virus de Sanarelli. En effet, le lapin d'Europe est, à l'égard du myxome, d'une sensibilité parfaite et, d'autre part, le virus du myxome l'infecte et le tue à l'unité ou, pratiquement, à la dose de quelques particules. Dans les évaluations que l'on fait de la teneur en virus des suspensions de myxome, lorsqu'on emploie, par exemple, des dilutions croissant de 10 en 10 (1/10, 1/100, 1/1 000, etc.), le dernier animal dans le sens de cette progression qui contracte la maladie meurt dans la même forme que les précédents et le premier qui reste indemne, celui-là même qui le suit immédiatement, conserve une réceptivité totale dont il témoigne régulièrement en succombant dans une forme elle-même banale lorsque, ultérieurement, on lui inocule effectivement le virus.

Parker est arrivé à la même conclusion lorsqu'il a soumis à l'analyse statistique les résultats d'inoculations intradermiques multiples à partir de dilutions graduées du virus [1].

INOCULATION PERCUTANÉE. — On sait que, dans la nature, les moustiques sont de redoutables agents de dissémination du virus de Sanarelli ; c'est ainsi que la trompe de tel *Aedes* qui s'est gorgé sur un lapin myxomateux peut rester infectante pendant plus de trois semaines pour les lapins qu'il pique [2]. Expérimentalement, on transmet facilement la maladie par piqûre du tégument avec une fine aiguille chargée de virus. L'observation suivante le montre. Au cours d'une séance d'inoculation, un lapin est présenté par erreur à l'opérateur ; l'aiguille de la seringue a tout juste effleuré de sa pointe la peau de l'animal lorsqu'on s'avise de la méprise et l'injection n'est pas pratiquée. Le lapin contracte la myxomatose et en meurt deux et trois jours avant les autres. Le virus employé dans cette expérience était une suspension au 1/50 de membrane chorio-allantoïdienne. Et cependant le procédé n'est pas d'une fidélité parfaite. Exemple : deux lapins, n^{os} 57 et 58, sont inoculés, chacun par 5 piqûres de la peau à la face interne de la cuisse ; on fait usage pour cela d'une fine aiguille d'histologie à pénétration limitée, que l'on charge de virus avant chaque piqûre

en l'enfonçant dans la substance d'un myxome prélevé sur un lièvre mort de myxomatose. Le premier de ces lapins présente les premiers signes d'infection, à la face interne de la cuisse, sept jours après l'inoculation et meurt de myxomatose après sept jours de maladie. Le deuxième lapin reste indifférent ; réinoculé ultérieurement par voie hypodermique, il mourra de myxomatose dans le délai de douze jours. La teneur du myxome en virus (1 000 unités par gramme) n'était probablement pas suffisante pour assurer le passage sur le lapin par le procédé choisi.

INOCULATION PAR DÉPÔT SUR LA CONJONCTIVE. — La conjonctive ne se laisse pas toujours franchir par le virus de Sanarelli ; l'expérience suivante qui a été réalisée avec un matériel virulent exactement dosé le montre bien. On met en suspension la substance d'un myxome et l'on en prépare deux dilutions, l'une au 1/20, l'autre au 1/100. Deux lapins, n^{os} 888 et 889, reçoivent respectivement, le premier par instillation dans les sacs conjonctivaux avec les précautions nécessaires pour ne pas traumatiser la muqueuse, et le deuxième par injection sous-cutanée, des quantités de chaque dilution équivalant à 1 cm³ au 1/1 000. Deux autres lapins, n^{os} 887 et 693, reçoivent respectivement par les mêmes voies des quantités dix fois supérieures, équivalant, par conséquent, à 1 cm³ au 1/100. Les lapins 889 et 693 qui ont reçu le virus sous la peau font une myxomatose classique et meurent en treize jours. Les lapins 888 et 887 qui ont reçu dans les sacs conjonctivaux les mêmes quantités de virus restent indifférents ; réinoculés ultérieurement par voie hypodermique, ils mourront en dix-huit et onze jours.

TRANSMISSION PAR CONTACT. — Elle ne se réalise pas de façon régulière. Alors que dans certains cas le sujet neuf contracte la myxomatose après avoir cohabité pendant moins d'un jour avec un malade, d'autres fois, mis successivement et sans discontinuité en contact avec des myxomateux, il reste indemne ; si, à la longue, il finit par contracter la maladie, alors elle évolue dans des délais ordinaires, parfois courts ; il en est de même lorsque, délibérément, on lui inocule le virus. Dans un ensemble de 17 essais de transmission par cohabitation, essais consistant à réunir dans une cage exiguë, et pour plusieurs jours, un lapin neuf et un malade, nous avons enregistré quatre échecs.

CONCLUSION. — L'inoculation sous-cutanée de matériel virulent permet de transmettre à coup sûr la myxomatose ; par cette voie le virus de Sanarelli tue le lapin neuf à l'unité, ou, pratiquement, à la dose de quelques particules. Il est vraisemblable que l'inoculation intradermique offre les mêmes garanties.

L'inoculation par piqure de la peau ou par dépôt sur la conjonctive comporte un pourcentage d'échecs que l'expérimentateur ne saurait tenir pour négligeable. Il en est de même de la transmission par contact.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. F. PARKER. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 439.
- [2] F. FENNER, M. F. DAY et G. M. WOODROFF. *Austral. J. exp. Biol.*, 1952, **30**, 139.

MÉLANGES DE MYCOBACTÉRIES DANS CERTAINS PRODUITS PATHOLOGIQUES. INTÉRÊT DE LEUR SÉPARATION

par J. VIALLIER et A. BERTOYE.

(Institut Bactériologique de Lyon.)

Dans un même produit pathologique, et bien que ceci soit une éventualité rare, deux mycobactéries peuvent coexister. Le mélange peut concerner deux ou plusieurs variétés d'une même espèce : *Mycobacterium tuberculosis* par exemple. Les exemples en sont fréquents au cours des traitements par les antibiotiques où l'expectoration peut renfermer des bacilles de provenance différente et, de ce fait, de sensibilité aux antibiotiques et d'aptitude pathogène différentes. Une autre éventualité, plus rare, est celle où, dans le même produit pathologique, coexistent deux mycobactéries d'espèces différentes, l'une pathogène, l'autre non pathogène. Nous avons déjà rapporté un cas de ce genre [1]. Un deuxième, plus récent, nous a incités à rédiger cette note, d'autant plus que D. Yegian et V. Budd [2] signalent, de leur côté, que l'apparition occasionnelle, dans les milieux de culture, de colonies de mycobactéries non pathogènes, qui ne peuvent être différenciées visuellement de celles de bacilles virulents, est une importante cause d'erreur dans le diagnostic et dans les épreuves de sensibilité aux antibiotiques. Dans nos deux cas, il s'agissait de mucosités prélevées par tubage gastrique, l'un chez un enfant atteint de primo-infection tuberculeuse et l'autre chez un adulte atteint de tuberculose pulmonaire. Il n'y avait pas de bacilles acido-alcoolo-résistants décelables à l'examen direct. Pour le premier, les mucosités recueillies ont été divisées en deux parts : l'une a été traitée selon le procédé classique, à l'acide sulfurique à 15 p. 100, puis le culot lavé ensemencé sur milieu de Löwenstein et en milieu de Dubos liquide ; l'autre a été inoculée à un cobaye. Les cultures en Dubos ont donné naissance à des colonies d'un bacille acido-alcoolo-résistant dont la morphologie et l'aspect des cultures évoquaient un bacille tuberculeux. Le cobaye, sacrifié soixante-huit jours après l'inoculation, montrait à l'autopsie des lésions classiques de tuberculose expérimentale et la souche fut isolée à partir du caséum d'un ganglion inguinal.

Les mucosités gastriques prélevées chez l'adulte ne renfermaient pas de bacille à l'examen direct. Elles furent, après traitement, ensemencées sur deux tubes de Löwenstein. L'un resta stérile, l'autre donna naissance à deux séries de quelques colonies différentes, les unes saillantes, les autres plates. Chacune correspondait à des bacilles acido-alcoolo-résistants qui furent isolés.

Dans ces deux cas, les repiquages en milieu de Youmans-sérum de cheval avaient un aspect très différent selon qu'il s'agissait de l'une ou l'autre souche et la sensibilité à l'isoniazide divergeait, ce qui nous incita à effectuer une étude précise de quelques caractères des souches isolées. Les résultats en sont résumés dans le tableau ci-joint.

	PREMIER CAS		DEUXIÈME CAS	
	Souche A	Souche B	Souche A	Souche B
Provenance	Mucosités prélevées par tubage chez un enfant atteint de primo-infection tuberculeuse.	Cultures en Dubos.	Mucosités prélevées par tubage chez un adulte atteint de tuberculose pulmonaire.	Cultures sur Löwenstein.
Isolement	Ganglion cobaye inoculé			
Acido-résistance. Alcoolo-résistance.	Persistant 10 minutes.	Persistant 10 minutes.	Persistant 10 minutes.	Persistant 10 minutes.
Sulfito-résistance	Persistant 24 heures.	Persistant 24 heures.	Persistant 24 heures.	Persistant 24 heures.
Colonies Youmans-sérum de cheval.	Colonies en grains, disposition serpentine.	Aspect homogène, disposition en amas.	Colonies en grains, disposition serpentine.	Aspect homogène, disposition en amas.
Inoculation sous-cutanée au cobaye.	Tuberculose expérimentale.	Négative.	Tuberculisations.	Négative.
Inoculation intra-péritonéale dans huile paraffine	Non faite.	Mort en 28 jours, lésions du péritoine, de la rate et du foie.	Non faite.	Mort, lésions péritonéales.
Sensibilité à :				
Streptomycine	— 1 µg.	+ 1 — 5 µg.	— 1 µg.	+ 100 µg.
P. A. S.	— 1 µg.	+ 20 ± 100 µg.	+ 1 — 5 µg.	+ 100 µg.
I N. H.	± 0,4 — 0,5 µg.	+ 20 µg.	— 0,4 µg.	+ 20 µg.
Rouge neutre	Coloration rouge.	Coloration jaune.	Coloration rouge.	Coloration jaune.
Bleu de Nil	Coloration bleue.	Coloration gris jaune.	Coloration bleu lilas.	Coloration gris jaune.

Malgré l'aspect très superposable des cultures, elles correspondaient à deux germes aux propriétés nettement différentes. On voit, en particulier, l'importance de l'erreur commise dans la détermination de la sensibilité aux antibiotiques s'il n'avait pas été tenu compte de ce mélange. Yegian et Budd, auxquels ces inconvénients n'ont pas échappé, signalent qu'en présence de ces discordances la virulence des cultures suspectes peut être rapidement déterminée par l'étude des modalités de la croissance dans le milieu de Tween liquide renfermant 5 p. 100 de plasma, et par l'inoculation au cobaye dans le cas où les cultures présentent en milieu liquide des formes intermédiaires en cordon.

Nous restons fidèles à l'épreuve de la croissance en milieu de Youmans-sérum de cheval où, macroscopiquement, le développement des mycobactéries non pathogènes est relativement homogène avec nombreuses colonies petites, beaucoup plus fines que celles des mycobactéries pathogènes ; microscopiquement, après fixation et coloration, les colonies apparaissent formées de bacilles disposés en amas, sans que l'on retrouve la disposition serpentine classique des formes virulentes.

La sensibilité à l'isoniazide des mycobactéries non pathogènes a été étudiée par A. Lutz [3], Linz et Lecoq [4], J. Brun et J. Viallier [5]. Elles ne sont pas sensibles à l'isoniazide aux concentrations de 10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. L'existence actuelle de souches iso-résistantes enlève de la valeur à cette épreuve. Néanmoins, en présence de ces deux caractères réunis, nous identifions toujours de façon plus précise la mycobactérie. D'autres épreuves apportent d'utiles renseignements, comme la coloration par le rouge neutre [6] ou le bleu de Nil [7]. L'inoculation au cobaye permettra l'isolement de la souche pathogène du mélange. L'existence de souches de bacilles iso-résistantes, non ou très peu pathogènes pour le cobaye, rend parfois cette séparation délicate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. VIALLIER et A. BERTOYE. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 819.
- [2] D. YEGIAN et V. BUDD. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1953, **68**, 557.
- [3] A. LUTZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1369.
- [4] R. LINZ et E. LECOQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1444.
- [5] J. BRUN et J. VIALLIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1332.
- [6] J. VIALIER et J. TIGAUD. *Ces Annales*, 1953, **85**, 746.
- [7] J. DESBORDES. *Ces Annales*, 1952, **83**, 809.

ÉTUDE PAR MICROÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER DU SÉRUM DE *VIPERA ASPIS* ET *VIPERA URSINI*

par J. FINE, J. GROULADE et A. EYQUEM.

(Laboratoire d'Hématologie
et des Groupes Sanguins de l'Institut Pasteur.
Centre Départemental de Transfusion sanguine de Grenoble.)

Les études que nous avons entreprises sur les hémagglutinogènes et les hémagglutinines du sang des reptiles, l'intérêt de ces hétéro-

agglutinines pour l'identification des antigènes hétérophiles communs à certains vertébrés, nous ont incités à examiner les différentes fractions des protéines sériques et plasmatiques chez deux espèces de reptiles : *Vipera aspis* et *Vipera ursini*.

Nous pouvions ainsi espérer isoler les fractions protéiniques contenant des anticorps intéressants, ou établir des comparaisons entre les différentes espèces.

Depuis le perfectionnement des techniques de micro-électrophorèse sur papier, en particulier en France, par Machebœuf et Rebeyrotte, il est facile d'appliquer cette technique à l'étude de petites quantités de sérum.

Nous avons ainsi pu étudier le sérum de 11 *V. aspis* et de 6 *V. ursini*, et le plasma de 2 *V. aspis*.

TECHNIQUE. — Les bandes de papier (Whatmann n° 1, Schleicher et Schull n° 2045 a) sont tendues horizontalement entre deux cuves de tampon au véronal (pH = 8,6). Elles sont soumises pendant treize heures à un courant continu de 160 volts (pour une longueur de bande de 25 cm) dont l'intensité est réglée à 0,5 millampère par bande de 4 cm de large.

On dépose à la pipette 25 mm³ de sérum suivant un trait de 3 cm perpendiculaire à l'axe de la bande et à 7 ou 8 cm de la cuve cathodique. Le protéinogramme s'étend sur 10 cm environ.

Après coloration avec l'Amidoschwartz 10 B, la bande rendue transparente est passée dans un électrophotomètre donnant, millimètre par millimètre, la densité optique des taches ou spots, selon la technique de Grassmann, Hanning et Knedel.

La courbe ainsi obtenue est planimétrée et les différentes fractions sont exprimées en pourcentage.

RÉSULTATS. — Les protéines du sérum de *V. aspis* et de *V. ursini* migrent avec des vitesses différentes qui permettent d'individualiser 6 fractions, que nous avons classées par analogie avec le protéinogramme humain, en commençant par celles dont la mobilité est la plus rapide :

Les albumines s'étageant en 2 fractions (albumine 1 et 2) ;

Les globulines α_2 ;

Les globulines β qui donnent le plus souvent 2 spots symétriques permettant de distinguer des globulines β_1 et β_2 ;

Les globulines γ .

La vitesse de déplacement de ces différentes fractions paraît égale aux fractions analogues du sérum humain.

Albumines. — Sont dédoublées en deux fractions :

Une fraction A_1 plus rapide ;

Une fraction A_2 se déplaçant avec une vitesse identique à celle des albumines humaines.

Globulines. — Les globulines β forment une tache dédoublée et symétrique dans la plupart des cas.

Elles présentent une importance à peu près égale à celle des albumines.

Les résultats expérimentaux exprimés en pourcentages sont transcrits dans le tableau I.

TABLEAU I. — Résultats exprimés en pourcentages.

		PROTEINES TOTALES	ALBUMINES		GLOBULINES			
			A _I	A ₂	α_2	β_1	β_2	γ
<u>V. ASPIS</u>	I	57	10,5	41,2	11,05	17	14,25	5,92
	2	50	7,2	42,5	7,2	15,2	9,77	18,1
	3	63	3,95	25,15	16,45	23	22	9,2
	4	52	9,5	32,9	16,85	15,2	13,15	12,35
	5	52	9,35	28,1	15,5	15,2	13,1	18,7
	6	60	6,35	23,8	18,4	18,4	15,65	17,15
	7	54	6,6	37,5	6,6	15,95	10,75	22,2
	8	66	4,17	24,4	10,55	21,4	19,45	20
	9	49	8,05	22,3	14,55	16,1	14,55	24,45
	10	52	7,42	37,1	11,4	17,8	8,92	17,3
	11	52	7,87	27,2	26,2	16,2	13,6	6,9
<u>V. URSINI</u>								
I	60	5,18	17,05	12,5	21	23,8	20,4	
2	60	6,8	28,1	10,6	27,2	16,15	11,05	
3	57	10,75	26,6	15,9	16,8	14	15,85	
4	60	10,8	35,8	11,65	15,55	14	12,1	
7	57	11,4	28,1	12,25	16,2	13,15	18,95	
8	61	12,05	25,2	12,55	16,9	15	18,05	

Les moyennes calculées accompagnées de l'écart moyen observé sont données par le tableau II, dans lequel nous avons inclus également les moyennes des différentes fractions du sérum humain.

Des graphiques représentant une courbe d'électrophorèse humaine (fig. 1), une courbe d'électrophorèse de *V. aspis* et de *V. ursini* (fig. 2 et 3) montrent les différences observées entre ces espèces.

REMARQUES. — L'écart moyen observé est proportionnellement plus élevé pour les globulines α_2 de *Vipera aspis*. Certaines fractions paraissent présenter des variations individuelles plus grandes que d'autres : par exemple, les albumines 1 et les globulines γ chez les deux espèces, les globulines α_2 chez *V. aspis*.

TABLEAU II. — Valeurs moyennes en pourcentage des différentes fractions protéiniques des sérums de reptiles comparées à celles des sérums humains.

	<u>SÉRUM HUMAIN</u>	<u>SÉRUM DE VIPERA ASPIS</u>	<u>SÉRUM DE VIPERA URSINI.</u>
<u>PROTEINES TOTALES</u>	72 ($\pm 4,9$)	55,1 (± 3)	59,1 ($\pm 1,05$)
<u>ALBUMINES</u>			
A ₁	-----	7,4 ($\pm 1,7$)	9,5 ($\pm 2,15$)
A ₂	60,2 ($\pm 3,9$)	31,1 ($\pm 4,85$)	26,8 ($\pm 4,87$)
<u>GLOBULINES</u>			
α_1	3,3 ($\pm 0,9$)	-----	-----
α_2	7,6 ($\pm 1,8$)	14,1 ($\pm 3,75$)	12,6 ($\pm 1,07$)
β_1	-----	17,4 ($\pm 1,1$)	19 ($\pm 1,68$)
	12,4 ($\pm 2,3$)	-----	-----
β_2	-----	14,15 ($\pm 2,6$)	16,01 ($\pm 1,4$)
γ	16,5 ($\pm 2,8$)	15,85 ($\pm 4,95$)	16 ($\pm 2,5$)

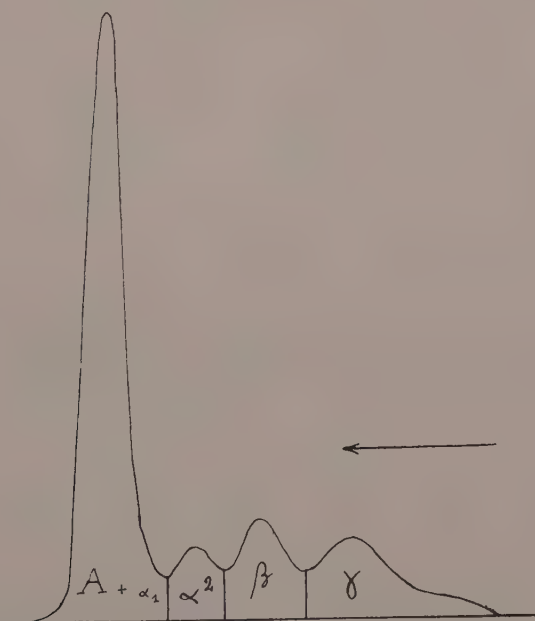


FIG. 1.

L'étude électrophorétique du plasma montre une courbe similaire à celle du sérum, avec un clocher supplémentaire représentant le

fibrinogène qui précipite au contact du papier avant d'avoir atteint son point d'équilibre électrophorétique (sa position normale en milieu liquide étant intermédiaire entre les globulines γ et β).

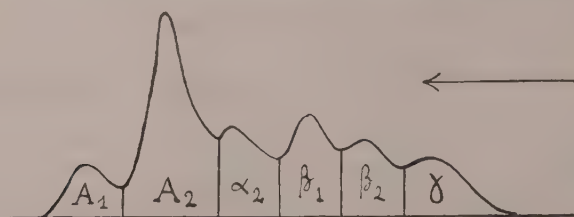


FIG. 2.

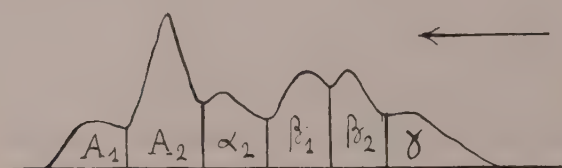


FIG. 3.

En conclusion. — Nous avons observé dans le protéinogramme de *V. aspis* et *V. ursini* le dédoublement des albumines et le dédoublement des globulines β .

Les globulines γ paraissent constituer la fraction subissant les plus grandes variations, ce qui est analogue à ce qui a déjà été observé chez l'homme.

ISOLEMENT DE *SALMONELLA MONTEVIDEO* POUR LA PREMIÈRE FOIS AU VIET-NAM

par J. FOURNIER, R. FAUCON, L. MIFFRED et R. SCHNEIDER.

(Hôpital Ciais à Haïphong, Institut Pasteur de Hanoï,
Laboratoire d'Armée de Haïphong.)

Salmonella montevideo, appartient au groupe C_1 dans le tableau de Kauffmann-White. Sa formule antigénique est « VI₁ (VI₂) VII... g, m, s ».

Depuis sa découverte en 1936 par Hormaeche et Peluffo [1] en Uruguay, elle est assez couramment rencontrée en médecine humaine et vétérinaire. En Amérique du Sud, elle est un agent banal de diarrhées estivales infantiles (Hormaeche, Peluffo et Aleppo [2]). Depuis 1939, sa présence chez l'homme a été signalée en divers points

du globe : Etats-Unis d'Amérique, Mexique, Grande-Bretagne, Danemark, Autriche, Italie, Palestine, Corée...

D'autre part, on l'a rencontrée chez le singe, chez le chien, chez le porc, chez les volailles et dans des poudres d'œufs desséchés.

Son isolement est généralement associé à des phénomènes morbides, le plus souvent à de la diarrhée. Dans un de leurs cas, Hormaëche et Peluffo (*loc. cit.*) l'ont cultivée à partir du pus d'un abcès du poumon chez un enfant. Beene, Hansen et Fulton [3] l'ont isolée du L. C.-R. d'un enfant atteint de méningite.

Mais il arrive souvent aussi qu'on la rencontre chez des porteurs apparemment sains, êtres humains ou animaux.

Jusqu'à ce jour on n'avait pas encore eu l'occasion de l'identifier au Viet-Nam. C'est pourquoi nous croyons intéressant de rapporter brièvement le cas suivant.

Au mois d'avril 1953, un militaire européen de 25 ans, en garnison à Haïphong (Nord-Vietnam), fut atteint brusquement d'un syndrome dysentérique aigu avec émission de selles glairo-sanglantes, qu'un traitement par l'émétine et la sulfaguanidine arrêta provisoirement.

Une rechute se produisit le mois suivant, à l'occasion de laquelle on mit en évidence dans les selles *Entamoeba histolytica* (formes végétatives). Le malade subit à l'hôpital un traitement par la conessine et la terramycine, traitement qui fut bien supporté et amena dès le cinquième jour la disparition du syndrome dysentérique et une grosse amélioration de l'état général. Cependant, le 6 octobre, se manifestait un léger mouvement fébrile accompagné d'une diarrhée banale, à l'occasion de laquelle nous isolâmes dans les selles le germe décrit ci-après. Le traitement par la terramycine (2 g par jour) qui avait été suspendu, fut repris. Dès le troisième jour, tout était rentré dans l'ordre et la guérison se maintient depuis.

DESCRIPTION DU GERME. — Bactéries Gram négatives, mobiles, M. R. positives, V. P. négatives ; attaquant avec production de gaz : arabinose, dulcité, maltose, mannite, rhamnose, xylose ; sans action sur l'adonite, lactose, salicine, saccharose ; utilisant le citrate en milieu de Simmons ; Stern-glycérol positives ; uréase-négatives ; produisant de l' H_2S et réduisant le R. N.

Les suspensions O (chauffées) de ce germe étaient électivement agglutinées (« slide agglutination ») en présence d'un sérum « VI, VII », ce qui classait aussitôt cette salmonelle dans le groupe C₁. Les suspensions H (formolées) étaient agglutinées (tube agglutination au thermostat-à-eau) en présence d'un sérum anti-S. *enteritidis* (g, m...) et, à un moindre degré, en présence d'un sérum anti-S. *oranienburg* (m. t...). La formule présumée comportait donc les antigènes « VI, VII... g, m... », ensemble qui, dans l'état actuel de nos connaissances, est caractéristique du type *montevideo*. Nous adressâmes cette souche au professeur Kauffmann [4] à Copenhague qui confirma et compléta notre diagnostic. Il s'agissait bien de S. *montevideo* « VI, VII... g, m, s. ».

SÉROLOGIE DU MALADE. — Le sérum du patient, prélevé vingt-sept jours après la guérison et la sortie de l'hôpital, donnait, en présence

de différentes suspensions de la souche isolée des selles, les réactions suivantes :

Suspensions vivantes : slide agglutination positive (lente) ;

Suspensions chauffées : tube agglutination : 0 à partir 1/20 ;

Suspensions formolées : tube agglutination : 0 à partir 1/20.

D'autre part, une réaction de Widal se montrait au même moment positive à 1/100 avec Eberth O et négative avec les autres antigènes, para C compris.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Nous avons isolé *S. monteideo* « VI, VII... g, m, s... » des selles d'un malade atteint d'amibiase intestinale aiguë à Haïphong (Nord Viet-Nam). Il ne semble pas que la salmonelle ait joué un rôle important dans les phénomènes morbides. C'est la première fois que ce type est signalé au Viet-Nam.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. HORMAECHÉ et C. A. PELUFFO. *Arch. Urug. de Med. Cir. y Especialid.*, 1936, 9, 673.
- [2] E. HORMAECHÉ, C. A. PELUFFO et P. L. ALEPPO. *Arch. Pediat. Urug.*, 1940, 11, 8.
- [3] M. L. BEENE, A. E. HANSEN et M. FULTON. *Am. J. Dis. Child.*, 1951, 82, 567.
- [4] F. KAUFFMANN. *Communication personnelle.*

PROCÉDÉ DE DIFFÉRENCIATION ENTRE *SPHEROPHORUS NECROPHORUS* (SCHMORL 1891) ET *SPHEROPHORUS FUNDULIFORMIS* (HALLE 1898)

par H. BEERENS.

(Institut Pasteur de Lille.)

Aucun critère n'a permis jusqu'à présent de différencier de façon indiscutable *Sph. necrophorus* et *Sph. funduliformis*. A.-R. Prévot [1, 2] a toujours soutenu l'individualité de ces espèces, alors que certains auteurs, tels Dack et coll. [3], Bergey [4], en ont défendu l'unicité. D'autres, les Allemands en particulier, ont plus vaguement désigné sous le terme « bacille de la nécrose » des souches qu'ils ne pouvaient identifier avec certitude. La distinction fondamentale repose sur l'habitat : on reconnaît une origine animale à *Sph. necrophorus*, humaine à *Sph. funduliformis*. Parmi les autres caractères susceptibles de les distinguer, nous signalerons : 1° le pouvoir pathogène pour le lapin, souvent plus marqué avec *Sph. necrophorus* qu'avec *Sph. funduliformis* ; 2° la sérologie : Prévot et Kirchheiner [5] signalent une

identité antigénique entre les deux espèces ; il semble exister, cependant, des souches possédant des caractères distincts.

En l'absence de caractères nettement tranchés, l'hémagglutination nous a fourni la possibilité d'individualiser ces deux espèces.

MATÉRIEL. — 1° Souches microbiennes :

a) *Sph. necrophorus*. Les souches 36, 50, 356 D, 696 D sont d'origine animale. 36 provient d'un abcès du foie chez un bovin ; 50 d'un cas de javart chez un cheval ; 356 D et 696 D nous ont été remis par le Dr A.-R. Prévot, Chef du Service des Anaérobies à l'Institut Pasteur de Paris, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements. La première a été isolée chez le bœuf, la seconde chez le mouton. Ces 4 souches sont donc, par leur origine, considérées comme des agents de la nécrose animale.

b) *Sph. funduliformis*. Les souches 1, 4, 5, 7, 11, 17, 21, 43, 58, 66, 70, 77, 92, 97 sont d'origine humaine. Elles ont été isolées dans les cas suivants : pleurésie (5, 11, 17, 43, 77, 92), abcès du cerveau (1), abcès périnéphrétique (4), infection biliaire (7), septicémie (21), nécrose sublinguale (97), abcès d'origine non précisée (58, 66, 70).

2° Globules rouges. Nos investigations se sont limitées aux hématies de poule, mouton, bœuf, cheval, lapin, cobaye, homme.

TECHNIQUE. — 1° Les hématies lavées sont mises en suspension dans l'eau salée à 8,5 p. 1 000 de manière à reconstituer le volume de sang initial.

2° Des bactéries, cultivées sous vide en bouillon VF glucosé à 2 p. 1 000, sont centrifugées et lavées. Le culot de 10 ml de culture est mis en suspension dans X gouttes d'eau salée (8,5 p. 1 000 de ClNa).

3° On mélange sur une lame I goutte de suspension microbienne et I goutte de suspension d'hématies. On lit immédiatement.

RÉSULTATS. — Ils sont consignés dans le tableau suivant :

DÉSIGNATION des souches	<i>Sph. necrophorus</i>				<i>Sph. funduliformis</i>															
	36	50	356 D	696 D	1	4	4	5	11	17	21	43	58	66	70	77	92	97		
Poule . . .	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Mouton . . .	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Bœuf . . .	+++	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Cheval . . .	+++	0	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Lapin . . .	+++	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0		
Cobaye . . .	+++	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	+	0	0		
Homme . . .	+++	+++	++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	+	0	0		

+++ , hémagglutination immédiate en gros agglutinats ; ++ , hémagglutination immédiate en petits agglutinats ; + , hémagglutination en petits agglutinats apparaissant après une minute d'agitation.

Les quatre souches de *Sph. necrophorus* agglutinent les globules rouges de poule, de mouton et d'homme. Les hématies de poule et de mouton

fournissent les résultats les plus spécifiques. Parmi les globules des autres espèces animales, ceux du cheval ne sont agglutinés que par deux souches ; ceux de lapin et de cobaye par trois. 356 D possède un pouvoir agglutinant moins étendu : il intéresse seulement les hématies de poule, mouton et homme.

Aucune des 14 souches de *Sph. funduliformis* n'agglutine les globules d'homme, poule ou mouton. Par contre, deux souches, 58 et 77, agglutinent les globules d'homme et de cobaye ; 77, en outre, agit sur ceux de lapin. Les hémagglutinats produits par *Sph. funduliformis* sont toujours petits et apparaissent tardivement ; ceux déterminés par *Sph. necrophorus* sont au contraire volumineux et immédiats.

CONCLUSIONS. — Il semble possible de différencier *Sph. necrophorus* de *Sph. funduliformis* par l'hémagglutination. Le premier agglutine rapidement et en volumineux amas les globules rouges de poule et de mouton. Le second est incapable de le faire. Ces conclusions ne seront définitives, cependant, que si le nombre des souches étudiées peut être plus important.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. Ces *Annales*, 1945, **71**, 317.
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Rev. méd. Liège*, 1953, **8**, 425.
- [3] DACK et coll. *Arch. Surg.*, 1935, **31**, 225 ; *J. Am. med. Assoc.*, 1936, **106**, 7 ; *J. inf. Dis.*, 1937, **60**, 335 ; 1938, **62**, 169, et 1939, **65**, 200.
- [4] BERGEY. *Manual of determinative Bacteriology*. Baltimore, 1948.
- [5] A.-R. PRÉVOT et E. KIRCHHEINER. *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 182.

HAUTES PRESSIONS ET ENZYMES MICROBIENS

PAR PAULETTE VIGNAIS et PIERRE VIGNAIS.

(Institut Pasteur, Service de Chimie Biologique.)

L'influence des hautes pressions hydrostatiques sur les réactions enzymatiques *in vitro* a suscité de nombreuses recherches. Mais leur action sur les enzymes à l'intérieur des cellules vivantes elles-mêmes mérite une attention particulière. Signalons que Johnson et Eyring [1] ont étudié la variation du pouvoir luminescent chez des bactéries lumineuses qui étaient soumises à de faibles pressions de l'ordre de 200 à 600 kg/cm².

Nous essayons actuellement d'analyser de façon systématique le pouvoir d'inactivation des hautes pressions sur différents enzymes d'une bactérie : *Escherichia coli*, souche Monod [2].

Les bactéries lavées, à « l'état non proliférant », sont soumises pendant un temps très court : cinq minutes, à des pressions hydrostatiques dont la valeur s'échelonne entre 1 500 et 4 000 kg/cm². Puis elles sont mises au contact d'un substrat. Les substrats choisis ont été :

Un monoacide : l'acide pyruvique.

Des diacides : acide fumarique, succinique, oxalacétique, α -cétoglutarique.

Un triacide : l'acide citrique.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL. — Les bactéries qui servent à la recherche du « pouvoir oxydasique » sont obtenues après deux subcultures successives sur le milieu nutritif suivant :

Peptone Vaillant	10 g
Phosphate dipotassique	5 g
Extrait de levure Springer	100 ml
Eau	Q.S. 1 l

Le pH est ajusté à 7.

La dernière culture est agitée pendant cinq heures sur une machine à secousses. La suspension est alors centrifugée, puis lavée deux fois à l'eau bidistillée.

On recherche la valeur du « pouvoir oxydasique » sur les bactéries « non proliférantes » témoins ou qui ont été soumises aux hautes pressions. La consommation d'oxygène est mesurée à l'appareil de Warburg. Les solutions des différents substrats sont préparées extemporanément (les substrats, sous leur forme acide, sont neutralisés à pH 7).

Chaque fiole de l'appareil contient :

— dans la cupule :

Suspension microbienne (poids sec 10 mg)	1 ml
Tampon phosphate M/15 de pH 7,2	0,1 ml

— dans le diverticule latéral : 0,2 ml de solution M/20 de substrat (soit 10 micromoles) ;

— dans le godet central : 0,2 ml de lessive de potasse à 20 p. 100.

Des fioles sans substrat servent à la mesure de la respiration endogène. La valeur de la consommation d'oxygène pour un substrat donné est obtenue après déduction de la respiration endogène.

RÉSULTATS. — Nous avons déterminé les pressions qui inactivent suffisamment un enzyme pour que celui-ci ne présente plus qu'une activité infime : inhibition supérieure à 90 p. 100 après un contact de cent minutes à 37° C avec 10 micromoles de substrat (1).

SUBSTRAT	PRESSIONS (kg/cm ²)	O ₂ (mm ³) (100 min.)	TÉMOINS O ₂ (mm ³) (100 min.)
Pyruvate	2 200	8	253
Oxalacétate	2 200	16	380
Fumarate	2 800	41	442
Succinate	3 600	55	600
Citrate	3 400	11	135
α -cétoglutarate	3 100	12	126

(1) Dans le cas du citrate nous avons utilisé 20 micromoles ; *E. coli* Monod, dans nos conditions expérimentales, métabolise faiblement ce substrat.

Soumises à des pressions inférieures aux pressions d'inactivation limites, les bactéries sont capables d'oxyder le substrat de façon partielle avec une vitesse plus faible que les bactéries témoins.

Dans les cas envisagés, les enzymes oxydatifs des acides mono-, di- et tricarboxyliques sont inactivés par des pressions de valeurs bien différentes. Il s'agit là évidemment d'un effet global concernant le métabolisme total du substrat envisagé. Il serait peut-être possible d'inhiber par des pressions convenables les enzymes correspondant aux différents échelons du métabolisme d'un même substrat. Cependant, avec les données obtenues, on peut déjà apprécier la sensibilité des différents systèmes oxydasiques. On voit, par exemple, qu'une pression peut entraîner, pour un système donné, une inhibition totale ou subtotale, mais laisser à d'autres systèmes une activité encore appréciable ; par exemple, une suspension d'*E. coli* qui a été comprimée à 2 200 kg/cm² n'oxyde pratiquement plus le pyruvate ou l'oxalacétate, mais est encore capable de métaboliser le succinate, le fumarate, l' α -cétooglutarate ou le citrate.

Il est donc possible, grâce à un agent physique, les hautes pressions, de dissocier l'activité de différents systèmes enzymatiques chez une bactérie : *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] F. JOHNSON, H. EYRING, R. STEBLAY, H. CHAPLIN, C. HUBER et C. GHERARDI.
J. gen. Phys., 1945, **28**, 463.
- [2] P. VIGNAIS et P. VIGNAIS. *Experientia* (sous presse).

Nous tenons à remercier J. Basset, qui a mis ses presses à notre disposition, et G. Lepesqueur qui réalisa les nombreuses mises en pression.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Mécanisme de formation des formes filtrables et invisibles,
par P. HAUDUROY.

Contribution à l'étude du métabolisme du bacille de Whitmore, par L. CHAMBON et P. DE LAJUDIE.

Pouvoir neutralisant des sérums étalons anti-œdématisants, anti-septicum et anti-histolyticum, par M^{lles} M. GUILLAUMIE, A. KREGUER, M. GEOFFROY et G. READE.

Sporotrichose expérimentale du hamster. Observation de formes astéroïdes de *Sporotrichum schenki*, par F. MARIAT et E. DROUHET.

L'action de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago sur les chenilles de *Galleria mellonella* L. et *Hyponomeuta cognatella* Hb, par C. TOUMANOFF.

Mise en évidence du pouvoir hémagglutinant du virus choriotrope, par P. LÉPINE et R. DE RUYCK.

LIVRES REÇUS

Adoption et santé mentale. Rapport final d'une réunion mixte ONU/OMS d'experts des problèmes de santé mentale se rattachant à l'adoption. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 70, 20 p. ; Prix : Fr. fr. 50 ; Fr. s. 0,60 ; 1 Sh. 3 d. ; Dollars 0,15. Dépositaire pour la France : Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

Ce rapport vise à améliorer les conditions actuelles d'adoption, notamment dans les pays occidentaux, en mettant en relief les principes de santé mentale qu'il est indispensable d'observer pour que l'adoption donne de bons résultats.

Les experts déclarent que la principale raison de l'adoption est « d'assurer le bonheur de l'enfant », le fait de donner satisfaction aux ménages sans enfants n'étant qu'une considération secondaire. L'adoption doit donc être préparée de façon à établir une situation qui facilite le sain développement de l'enfant en lui assurant des soins parentaux suivis et la sécurité d'un cadre familial.

Tout au long de ce rapport, les experts insistent également sur les qualités de compréhension que doit posséder le personnel chargé des démarches très compliquées de l'adoption pour être capable de se rendre compte de ce que ces démarches signifient pour les intéressés, et spécialement pour l'enfant adopté.

H. T.

Lèpre. Premier rapport du Comité d'experts de la lèpre (OMS). Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 71, 31 p. Prix : Fr. fr. 65 ; Fr. s. 0,80 ; 1 Sh. 6 d. ; Dollars 0,20. Dépositaire pour la France : Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

Le Comité étudie particulièrement les inconvénients de l'isolement obligatoire. Les malades craignent, en effet, de briser la cohésion de leur famille et de laisser sans ressources les personnes qui sont à leur charge ; ils craignent encore plus d'être maintenus indéfiniment dans une léproserie ; aussi ont-ils tendance à dissimuler leur maladie à un moment où le traitement serait particulièrement efficace et alors qu'ils constituent un danger pour leur entourage. Pour toutes ces raisons et à cause de la contagiosité relativement faible de plusieurs formes de cette maladie, il y aurait lieu de réexaminer les pratiques actuellement suivies à l'égard de l'isolement obligatoire.

Quant au traitement de la lèpre, le rapport souligne que les sulfones se sont révélées supérieures à tout autre médicament. Du fait que ce médicament est efficace aussi bien par voie buccale que par injection, son emploi est indiqué pour le traitement post-thérapeutique et d'autres formes de traitement ambulatoire. Le comité a aussi examiné la valeur thérapeutique des thiosemicarbazones et d'autres agents thérapeutiques, tels que la streptomycine. Le rapport contient, en outre, des sections sur l'épidémiologie, l'immunologie, et la classification de la lèpre.

H. T.

Peste. Deuxième rapport du Comité d'experts de la peste (OMS). Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 74, 14 p. Prix : Fr. fr. 30 ; Fr. s. 0,40 ; 9 d. ; Dollars 0,10. Dépositaire pour la France : Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

Les récentes acquisitions de la science ont décuplé les possibilités de lutte contre la peste. Les sulfamides, les antibiotiques, de nouveaux rodenticides, des pulicides plus efficaces ont permis de rapides progrès dans le traitement et la prophylaxie de la maladie, la protection des contacts, l'extermination des rongeurs et la destruction des puces. Le rapport sur la deuxième session du Comité d'experts de la peste de l'OMS donne sous une forme succincte les résultats d'expériences faites au cours des dernières années dans la lutte contre la peste, qui, dans certaines régions, a diminué de façon impressionnante. Il rend compte en outre de quelques enquêtes sur le rôle des rongeurs sauvages dans la transmission du fléau, énumère les procédés permettant de distinguer le bacille pseudo-tuberculeux et décrit les méthodes fondamentales utilisées au laboratoire pour le diagnostic de la maladie.

H. T.

Répertoire mondial des écoles de médecine. Organisation mondiale de la Santé (1953). 1 vol., 220 pages (relié toile). Prix : F. fr. 1 200 ; Fr. s. 15 ; Sh. 25 ; Dollars 4,00. Edition bilingue, français et anglais. Dépositaire pour la France : Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

Ce volume a pour but de rendre aisément accessible tout un ensemble d'informations sur les établissements d'enseignement médical du monde entier.

Plus d'un demi millier d'établissements sont mentionnés dans le répertoire. Outre le nom et le lieu, on a donné, dans la mesure du possible, les renseignements suivants : date de la fondation ; nature de l'administration ; durée de l'année universitaire ; conditions d'admission ; personnel enseignant à plein temps et à temps partiel ; nombre total d'étudiants de chaque sexe ; nombre d'étudiants nouveaux admis chaque année ; langue d'enseignement ; durée des études nécessaires à l'obtention du diplôme ; diplômes délivrés ; nombre annuel de diplômés, droits d'inscription annuels.

H. T.

T. J. Mackie et J. E. McCartney. — *Handbook of practical Bacteriology. A guide to bacteriological laboratory work.* 9^e édition. 1 vol., 677 pages. E. et S. Livingstone, édit., Edinbourg et Londres. Prix : 25 shillings.

Cette 9^e édition a été révisée en tenant compte des progrès récents de la bactériologie, mais le plan général des éditions précédentes a été conservé. L'ouvrage comprend, après une Introduction, une première partie, consacrée aux techniques bactériologiques, dans laquelle on a inclus les méthodes les plus modernes ; puis une seconde partie, qui étudie les différents groupes d'organismes pathogènes ou commensaux, ainsi que leur diagnostic bactériologique : bactéries diverses, virus, rickettsies, champignons pathogènes, trypanosomes, leishmania, toxoplasmes. Un index alphabétique très complet permet de retrouver rapidement le sujet cherché.

H. T.

G. Hanfield. — *Recent advances in Pathology*, 6^e édition. 1 vol., 374 p. I. et A. Churchill, édit., Londres, 1953. Prix : 30 shillings.

Cette dernière édition des « Recent advances in Pathology », est une mise au point des connaissances actuelles en médecine sur les sujets suivants : 1^o l'inflammation, 2^o l'allergie, 3^o le système réticulo-endothélial et sa physiologie, 4^o les réticuloses et les réticulo-sarcomes, 5^o le cancer : la carcinogénèse expérimentale, l'étiologie (hypothèse d'un virus), les facteurs sociaux et héréditaires, les facteurs hormonaux (une mention spéciale pour les travaux de Greenstein concernant les enzymes des tissus cancéreux), 6^o les syndromes cardio-vasculaires, 7^o les maladies pulmonaires avec une étude particulière des pneumoconioses, 8^o le foie : étude expérimentale des cirrhoses et des hépatites, 9^o la fonction rénale, 10^o les glandes endocrines.

Nous recommandons particulièrement aux biologistes les chapitres consacrés à l'inflammation et à l'allergie, excellents résumés des connaissances actuelles sur ces questions. Le texte est toujours très clair, l'iconographie excellente, la bibliographie suffisante.

J. G.

C. Albahary. — *Maladies médicamenteuses d'ordre thérapeutique et accidentel.* 1 vol., 752 p., 55 fig., Masson et C^{ie}, édit., 1953. Prix : broché, 4 400 fr. ; cartonné toile, 5 000 fr.

Cet important volume fait une étude très complète de tous les accidents que les divers médicaments sont susceptibles d'engendrer. Les drogues modernes sont de plus en plus actives et souvent, par là même, de plus en plus dangereuses. Les risques sont nombreux : intoxication véritable, surdosage, réactions de l'organisme ou d'un tissu sensibilisé, intolérance, etc. L'auteur passe en revue les substances les plus diverses, depuis les substances de synthèse jusqu'aux sérums thérapeutiques, en passant par les extraits végétaux, les antibiotiques et les hormones. Pour chacun des neuf chapitres de l'ouvrage sont envisagés successivement, après quelques généralités : les propriétés

physiques et chimiques des corps étudiés, le métabolisme, la clinique, le diagnostic, les indications préventives ou curatives. L'auteur souligne bien qu'il n'a nullement eu l'intention de mettre en doute la valeur des acquisitions modernes de la thérapeutique, mais seulement d'attirer l'attention sur la nécessité de prescriptions prudentes, que la connaissance exacte des risques courus permettra aux médecins de réaliser.

H. T.

C. Lerche. — *Electrophoresis of Micrococcus pyogenes aureus*. 1 vol., 194 p., R. Andvord, édit., Oslo, 1953.

La première partie de ce travail est constituée par une importante revue de la littérature sur la question. La seconde est le résultat des expériences de l'auteur, qui s'est proposé d'étudier les variations de la sensibilité de *M. pyogenes aureus* à l'électrophorèse quand les conditions de sa multiplication sont modifiées de différentes façons. De l'ensemble des résultats obtenus, on peut conclure que la réaction des lipides de la surface de *M. aureus* varie d'une façon considérable suivant les conditions physiques ou chimiques dans lesquelles s'opère la croissance du microorganisme. Ceci prouve les relations qui doivent exister entre la constitution de la surface cellulaire et les facteurs du milieu extérieur et permet certaines déductions en ce qui concerne les rapports entre divers aspects du métabolisme et les propriétés de surface.

H. T.

Immunochemistry. 1 vol., 94 p., Cambridge University Press, édit., 1953. Prix : 12 sh. 6 d.

Il s'agit des communications présentées au X^e Symposium de la Biochemical Society, qui s'est tenu à Londres le 15 novembre 1952. Le volume comprend les articles suivants, chacun d'eux accompagné de sa bibliographie : Les réactions d'immunité et leurs rapports avec la structure des protéines, par J. R. Marrack ; L'interaction antigène-anticorps dans le cas de l'emploi d'enzymes comme antigènes, par B. Cinader ; Les réactions des toxines avec les antitoxines, par W. E. van Heyningen ; L'emploi des isotopes en immunologie, par G. E. Francis ; Antigènes et anticorps dans l'hypersensibilisation, par P. G. H. Gell ; Le rôle des glucides en immunochimie, par M. Stacey ; Les rapports du complément avec l'azote fixé par les précipités antigène-anticorps, par R. G. S. Johns.

H. T.

A. Sorsby. — *The causes of blindness in England, 1948-1950*. 1 vol., 41 p. H. M. S. Stationery Office, édit., Londres, 1953. Prix : 2 shillings.

Cette étude envisage deux catégories de cécité : cécité due à la même cause pour les deux yeux, cécité due à une cause différente pour chacun des deux yeux, le premier groupe comprenant 92,3 p. 100 du nombre total des aveugles. Ceux-ci étaient en 1948, en Angleterre, au nombre

de 77 390, ce qui représentait une légère augmentation par rapport à 1938 (71 875). Depuis 1948, cette augmentation s'est accentuée. Elle est due, pour la plus grande part, à l'accroissement de la population et à la longévité plus grande. Cependant on remarque également une légère augmentation du nombre des aveugles chez les enfants, bien que, chez ceux-ci, les deux principales causes qui jouaient jusqu'ici, la syphilis congénitale et l'ophtalmie des nouveau-nés, ne représentent plus que 1 p. 100 des cas ; mais ce sont toujours des affections héréditaires ou congénitales qui sont surtout responsables de la cécité chez les enfants. Chez les sujets âgés, la cécité est due principalement à la cataracte et au glaucome ; mais il y a lieu de remarquer que 80 p. 100 des individus atteints de cataracte faisant l'objet de la présente étude n'avaient pas été opérés. On peut donc espérer qu'avec de meilleures méthodes diagnostiques et chirurgicales on arrivera à réduire le nombre des aveugles.

H. T.

C. H. Gray. — *Clinical chemical pathology*. 1 vol., 138 p., 15 fig., E. Arnold, édit., Londres, 1953. Prix : 10 sh. 6 d.

Ce petit livre reproduit une série de conférences faites par l'auteur devant les étudiants en médecine de King's College, et passe successivement en revue la fonction rénale, l'équilibre acide-base, l'œdème et ses causes, la fonction hépatique et les tests d'exploration fonctionnelle du foie, la glycémie et le diabète, la pathologie du tube digestif et les épreuves biochimiques dans les maladies endocrines. Dans un appendice sont décrites quelques-unes des principales réactions courantes à opérer sur l'urine, le sang, les selles, etc. Ce volume sera utile, non seulement aux étudiants, mais aussi, comme le souhaite son auteur, aux praticiens et aux travailleurs de laboratoire, et même à tous ceux qui, sans être médecins, chercheront des renseignements concis sur une question précise.

H. T.

Adaptation in micro-organisms. 1 vol., 339 p., Cambridge University Press, 1953. Prix : 30 shillings.

Communications présentées au III^e Symposium de la Society for General Microbiology, qui s'est tenu à Londres en avril 1953. Il s'agit de quinze notes rédigées par les principaux spécialistes de la question. Le sujet est envisagé sous tous ses aspects : l'évolution chez les micro-organismes, le rôle des enzymes dans l'adaptation, l'apparition de la résistance aux médicaments, les variations et l'adaptation chez les bactériophages, les paramécies et les champignons. Chaque article est accompagné des discussions, souvent fort étendues, qui l'ont suivi, ainsi que de sa bibliographie. L'ensemble du volume constitue une mise au point des toutes dernières acquisitions sur la question de l'adaptation des microorganismes, et il sera utile à la fois aux bactériologistes, aux biochimistes, aux généticiens et à tous ceux qui s'intéressent à l'évolution des organismes vivants.

H. T.

J. Foucher et F. Billet. — *Dictionnaire de Chimie trilingue, français-allemand-anglais*. 1 vol., 449 p., éditions de la Wervereis, Baden-Baden, 1953. Prix de vente dans les librairies en France : 4 500 fr.

Ce dictionnaire a été rédigé par deux Français, un Polytechnicien et un Centralien, et présente les principaux termes chimiques successivement dans chacune des trois langues : français, allemand, anglais. On se trouve ainsi en possession d'un triple dictionnaire, qui permet de trouver l'équivalent, dans chacune des deux autres langues, d'un terme donné dans l'une d'entre elles. Lorsqu'un mot comporte des synonymes, ils sont également indiqués et les formules chimiques développées sont placées à côté de chacune des substances auxquelles elles correspondent, ce qui évite tout ambiguïté dans la nomenclature. Enfin, non seulement les auteurs ont réuni tous les mots relatifs à la chimie et à ses applications, mais ils ont donné, pour un grand nombre de termes d'emploi courant, une définition qui en précise le sens. Le volume est complété par un appendice, qui comprend un tableau de conversion des degrés Fahrenheit en centigrades, une liste des poids atomiques des différents corps, une table d'équivalence des poids et mesures anglais et du système métrique et enfin un tableau de la classification périodique des éléments de Mendéléeff. Ce dictionnaire est appelé à rendre les plus grands services à tous ceux qui, sans être des spécialistes, auront à connaître des ouvrages de chimie, en leur permettant de s'y orienter avec une plus grande facilité.

H. T.

Fritz Heepe. — *Die unspezifischen Bluteiweissreaktionen. Kolloid-Labilitätsreaktionen im Serum und Plasma als Hilfsmittel zur Krankheitserkennung*. 1 vol., XVII + 242 p, 13 tableaux. Dietrich Steinkopff, Darmstadt, édit., 1953. Prix broché : 30 RM.

Cet ouvrage constitue un inventaire très complet des nombreuses réactions non spécifiques qui permettent l'étude des protéines sanguines. Ces réactions sont groupées d'après leur communauté de caractères et l'auteur passe en revue leur mécanisme d'action, les possibilités et les limites de leur utilisation. Une abondante bibliographie contenant 4 500 références ajoute encore à l'intérêt que cet ouvrage aura pour les biochimistes, les sérologistes et les cliniciens. Le chercheur y trouvera réunies toutes les techniques d'étude des colloïdes utilisées en Europe et en Amérique.

A. E.

Le Gérant : G. MASSON.